

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LES HERBICIDES ET LEUR MÉLANGE :  
COMMENT AFFECTENT-ILS LA PHOTOSYNTHÈSE DE *MICROCYSTIS*  
*AERUGINOSA* ?

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR  
LIANE DURAND

JANVIER 2009

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le docteur Philippe Juneau qui m'a ouvert les portes de son laboratoire et de la recherche afin que je puisse connaître le fascinant monde de la recherche scientifique.

Je tiens aussi à remercier le docteur Radovan Popovic qui par sa passion et sa grande chaleur humaine a su m'insuffler de l'intérêt pour la préservation de l'environnement et les processus primordiaux des plantes.

Je tiens à remercier Denis Flipo pour sa grande patience et son aide lorsque je travaillais avec le cytomètre en flux. Son aide m'a été précieuse, sans lui je n'y serais pas arrivée.

Je remercie ce comité qui prendra la peine de lire et de commenter ce document afin que je puisse le parfaire et laisser un écrit à la hauteur des recherches que j'ai menées.

Merci à ma famille qui, par sa seule présence, me donnait le courage de continuer. Tout ce que je fais présentement et ferai tout au long de ma vie, je le lui dédie. Ma famille est mon moteur et ma force. Elle est le fondement de ma vie.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xvi
LISTE DES SYMBOLES.....	xxiv
RÉSUMÉ.....	xxvi

## INTRODUCTION

Problématique agricole.....	1
<i>Microcystis aeruginosa</i> .....	1
Effets des herbicides sur la cyanobactérie <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	2

## CHAPITRE I

I. HERBICIDES.....	5
1.1. Présence des herbicides dans le milieu .....	5
1.2. Mode d'action des produits phytosanitaires utilisés couramment.....	7
1.3. Interaction des herbicides.....	13
1.4. Concentration addition versus action indépendante.....	14

## CHAPITRE II

II. EFFETS DES HERBICIDES SUR L'ENVIRONNEMENT AQUATIQUE.....	17
2.1. Effets sur les organismes photosynthétiques.....	17
2.2. Effets sur les cyanobactéries.....	21

2.3. Production des espèces réactives oxygénées.....	22
--	----

### CHAPITRE III

III. LA PHOTOSYNTHESE.....	24
3.1. Aperçu général.....	24
3.2. Phase claire de la photosynthèse.....	25
3.3. Phase obscure de la photosynthèse.....	29
3.4. Les antennes collectrices de lumière des cyanobactéries se distinguent.....	31

### CHAPITRE IV

IV. LA FLUORESCENCE.....	36
4.1. Dissipation de l'énergie lumineuse et fluorescence.....	36
4.2. Principes à la base de l'analyse au Pulse Amplitude modulation (PAM).....	37
4.3. Paramètres du PAM.....	39
4.3.1 Les paramètres liés aux mesures de fluorescence faites au PAM .....	40
4.4. Paramètres du Plant Efficiency Analyser (PEA).....	42
4.5. Effets des stress sur le transport des électrons et la cinétique de fluorescence.....	43
4.6. Défense des organismes photosynthétiques.....	45

### CHAPITRE V

V. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	48
5.1. Matériel biologique.....	48
5.2. Milieu de culture.....	49
5.3. Tests sur les effets des herbicides sur la photosynthèse de <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	50
5.3.1. Herbicides.....	50
5.4. Tests fluorimétriques.....	53
5.5. Espèces réactives oxygénées.....	55
5.6. Dosage de la chlorophylle.....	55
5.7. Spectres d'absorption.....	56

5.8. Statistiques.....	56
------------------------	----

## CHAPITRE VI

VI. RÉSULTATS ET DISCUSSION : UTCC 299.....	58
6.1. AATREX.....	58
6.1.1. Croissance .....	58
6.1.2 Contenu en chlorophylle.....	58
6.1.3. Volume cellulaire et granulosité.....	60
6.1.4. Espèces réactives oxygénées.....	62
6.1.5. PAM.....	63
6.1.6. PEA.....	64
6.1.7. Analyse condensée.....	69
6.2. DUAL MAGNUM ET DUAL II MAGNUM.....	72
6.2.1. Croissance.....	72
6.2.2. PAM.....	72
6.2.3. PEA.....	72
6.3. PRIMEXTRA II MAGNUM .....	75
6.3.1. Croissance.....	75
6.3.2. Contenu en chlorophylle.....	75
6.3.3. Volume cellulaire et granulosité.....	77
6.3.4. Profil pigmentaire.....	83
6.3.5. Espèces réactives oxygénées.....	85
6.3.6. PAM.....	87
6.3.7. PEA.....	92
6.3.8. Analyse condensée.....	95
6.4. PRIMEXTRA RECONSTITUÉ.....	101
6.4.1. Croissance.....	101
6.4.2. Volume cellulaire.....	103
6.4.3. PAM.....	104
6.4.4. PEA.....	108

6.5. BENOXACOR.....	112
6.5.1. Croissance.....	112
6.5.2. Volume cellulaire.....	112
6.5.3. PAM.....	113
6.5.4. PEA.....	114
6.5.5. Analyse condensée.....	116

## CHAPITRE VII

VII. RÉSULTATS ET DISCUSSION : UTCC 632.....	118
7.1. AATREX.....	118
7.1.1. Croissance.....	118
7.1.2. Contenu en chlorophylle.....	118
7.1.3. Volume cellulaire et granulosité.....	119
7.1.4. Espèces réactives oxygénées.....	120
7.1.5. PAM.....	122
7.1.6. PEA.....	124
7.1.7. Analyse condensée.....	126
7.2. DUAL MAGNUM ET DUAL II MAGNUM.....	127
7.2.1. Croissance.....	127
7.2.2. PAM.....	127
7.2.3. PEA.....	128
7.3. PRIMEXTRA II MAGNUM.....	130
7.3.1. Croissance.....	130
7.3.2. Contenu en chlorophylle.....	130
7.3.3. Volume cellulaire et granulosité.....	132
7.3.4. Profil pigmentaire.....	133
7.3.5. Espèces réactives oxygénées.....	134
7.3.6. PAM.....	135

7.3.7. PEA.....	137
7.3.8. Analyse condensée.....	141
7.4. PRIMEXTRA RECONSTITUÉ.....	143
7.4.1. Croissance.....	143
7.4.2. Volume cellulaire.....	144
7.4.3. PAM.....	146
7.4.4. PEA.....	148
7.5. BENOXACOR.....	151
7.5.1. Croissance.....	151
7.5.2. Volume cellulaire.....	151
7.5.3. PAM.....	151
7.5.4. PEA.....	153

## CHAPITRE VIII

VIII. COMPARAISON ENTRE LES DIFFÉRENTS HERBICIDES.....	158
8.1. UTCC 299.....	158
8.1.1 PAM.....	158
8.1.2. PEA.....	159
8.2. UTCC 632.....	160
8.2.1. PAM.....	160
8.2.2. PEA.....	161
8.3. Spectres d'absorbances.....	162
8.4. Différences entre les espèces.....	163
CONCLUSION.....	165
RÉFÉRENCES.....	169



ANNEXE A.....	196
ANNEXE B.....	198

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Photosystème II.....	8
Figure 3.1. Schéma illustrant les composantes de l'appareil photosynthétique.....	25
Figure 3.2. Cycle de l'oxydation de l'eau dans le complexe de dégagement d'oxygène. Il est proposé que le système d'oxydation de l'eau passe par 5 étapes successives de S0 à S4. Le transfert des électrons de l'eau (2 H <sub>2</sub> O) s'effectue en une étape; le complexe emmagasine donc 4 e <sup>-</sup> (état S <sub>0</sub> ). Le complexe cède ensuite ces électrons successivement 1 à 1 en 4 étapes (S <sub>1</sub> , S <sub>2</sub> , S <sub>3</sub> et S <sub>4</sub> ) à quatre molécules de P <sub>680</sub> <sup>+</sup> apparues consécutivement à l'absorption de 4 photons, ce qui régénère les 4 molécules P <sub>680</sub> qui sont susceptibles d'être à nouveau excitées.....	27
Figure 3.3. Régénération du P <sub>680</sub> . Chaque électron émis au cours de ce cycle lors de la transition entre deux états S (ici S <sub>1</sub> /S <sub>2</sub> ) permet la régénération d'une molécule de chlorophylle.....	27
Figure 3.4. Cycle simplifié de Calvin Benson. Pour fonctionner, il nécessite des intermédiaires énergétiques (ATP et NADPH) produits par la phase photochimique. Le cycle comporte trois étapes essentielles: l'incorporation proprement dite du CO <sub>2</sub> , la réduction du 1,3-phosphoglycérate en trioses, puis la régénération du RUBP à partir d'une fraction des trioses formés.....	30
Figure 3.5. Régénération du Ribulose 1-5 bis phosphate à partir des trioses phosphate. Seuls les nombres de carbones des molécules sont pris en compte pour représenter le processus de régénération.....	30
Figure 3.6. Antennes collectrices de lumières chez les plantes vertes et les algues vertes et les complexes antennaires phycobilisomes. LHC (light harvesting complex) est l'antenne collectrice de lumière autour du PSII des plantes vertes et des algues. Le phycobilisome est la structure en éventail au dessus du PSII des cyanobactéries.....	32

Figure 3.7. Exemple de phycobilisomes. Photomicrographie électronique de phycobilisomes de *Synechococcus lividus*. PBS correspond aux phycobilisomes. La ligne au-dessus correspond à 0,5  $\mu\text{m}$  .....33

Figure 3.8. La structure schématique du phycobilisome de *Synechocystis* sp. PC= phycocyanine; APC= allophycocyanine;  $L_{cm}$ = «linker» membranaire du coeur (core-membrane linker),  $l_c$ = «linker» interne du complexe (core linker);  $L_{rc}$ = «linker» interne des bâtonnets de pigments (rod core linker);  $l_r$ =«linker» intra-bâtonnets (rod linker).....34

Figure 4.1. Voies dissipatives de l'énergie lumineuse captée.....37

Figure 4.2. Relation entre la fluorescence et le transport des électrons. Un blocage du transport des électrons par un inhibiteur du PSII tel que le diuron entraîne une ré-émission de la fluorescence de façon maximale car l'énergie ne peut être dissipée via la photochimie ( $F_{max}$  sur la figure).  $F_0$  est la fluorescence intrinsèque de la chlorophylle du PSII. ....39

Figure 4.3. Courbe de cinétique d'induction de fluorescence PAM.....41

Figure 4.4. Courbe de cinétique rapide (OJIP-test). Les différentes inflexions de la courbe correspondent aux états d'oxydo-réduction des quinones du PSII. À partir de ce type de courbe, il est possible de déterminer où se situe l'action d'un herbicide sur le PSII.....43

Figure 5.1. Structure des herbicides et phytoprotecteur utilisés.....51

Figure 6.1.1. Quantité de chlorophylle *a* par cellules chez UTCC 299 exposée à 0, 0,01 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Aatrex pendant 24 et 96 heures.....59

Figure 6.1.2. Granulosité des cellules de *Microcystis* UTCC 299 exposée pendant 24 heures à 0, 0,01, 0,05 et 0,1  $\mu\text{M}$  d'Aatrex. Les unités sont arbitraires.....61

- Figure 6.1.3. Granulosité des cellules de *Microcystis* UTCC 299 exposée pendant 96 heures à 0, 0,01, 0,05 et 0,1  $\mu$ M d'Aatrex. Les unités sont arbitraires.....61
- Figure 6.1.4. Formation d'espèces réactives oxygénées chez UTCC 299 exposé à 0, 0,01, 0,05 et 0,1  $\mu$ M de Aatrex pendant 24 heures et 96 heures et mesurée au FACScan grâce à la sonde DCFH-DA (2'-7'-dichlorofluoresceine diacétate). Excitation à 488 nm et l'émission à 525 nm. La détection des espèces réactives oxygénées (ERO) se fait en FL-1. Les valeurs sont arbitraires (u.a.).....62
- Figure 6.1.5. Cinétique de fluorescence obtenue au PAM pour UTCC 299 exposée 0 (A) et à 0,1  $\mu$ M (B) de Aatrex pendant 96 heures.....64
- Figure 6.1.6. Courbe de cinétique rapide obtenue au PEA pour UTCC 299 exposée à 0, 0,01, 0,05 et 0,1  $\mu$ M d'Aatrex pendant 96 heures. La courbe en gras est le témoin. On remarque une hausse du niveau J indiquant par ce fait un blocage entre  $Q_A$  et  $Q_B$ .....68
- Figure 6.3.1. Quantité de chlorophylle *a* par cellules chez UTCC 299 exposée à 0, 0,01 et 0,1  $\mu$ M de Primextra II magnum pendant 24 et 96 heures.....76
- Figure 6.3.2. Granulosité des cellules de *Microcystis* UTCC 299 exposée pendant 24 heures à 0, 0,01, 0,05 et 0,1  $\mu$ M de Primextra II magnum. La granulosité est en valeurs arbitraires.....79
- Figure 6.3.3. Granulosité des cellules de *Microcystis* UTCC 299 exposée pendant 96 heures à 0, 0,01, 0,05 et 0,1  $\mu$ M de Primextra II magnum. La granulosité est en valeurs arbitraires.....79
- Figure 6.3.4. Granulosité des cellules de UTCC 299 exposée au Primextra II magnum en fonction de taille des antennes à 96 heures.  $R^2=0,67$ . .....80
- Figure 6.3.5. Granulosité des cellules de UTCC 299 exposée au Primextra II magnum en fonction de la chlorophylle *a* totale à 96 heures.  $R^2=0,56$ .....81

Figure 6.3.6. Profil d'absorbance des pigments de UTCC 299 pour le témoin et l'échantillon testé avec 0,1  $\mu$ M de Primextra II magnum après 96 heures. Le trait en gras est le témoin.....84

Figure 6.3.7. Formation d'espèces réactives oxygénées chez UTCC 299 exposée à 0, 0,01, 0,05 et 0,1  $\mu$ M de Primextra II magnum pendant 24 heures et 96 heures et mesurée au FACScan grâce à la sonde DCFH-DA (2'-7'-dichlorofluoresceine diacétate). Excitation à 488 nm et émission à 525 nm. La détection des ERO se fait en FL-1. Les valeurs sont arbitraires.....86

Figure 6.3.8. Relation entre la chlorophylle par volume et les ERO formées à 24 heures chez UTCC 299 exposée au Primextra II magnum. On obtient un  $R^2$  de 0,62. Deux valeurs ont été retirées.....87

Figure 6.3.9. Cinétique de fluorescence obtenue au PAM pour UTCC 299 exposée à 0 (A) et 0,1  $\mu$ M (B) de Primextra II magnum pendant 96 heures.....88

Figure 6.3.10. Relation entre le  $UQF_{rel}$  et la taille des antennes à 96 heures chez UTCC 299 exposée au Primextra II magnum. On obtient un  $R^2$  de 0,72.....89

Figure 6.3.11. Relation entre le NPQ et la taille des antennes à 24 heures chez UTCC 299 exposée au Primextra II magnum. On obtient un  $R^2$  de 0,86. ....90

Figure 6.3.12. Courbe de cinétique rapide obtenue au PEA pour UTCC 299 exposée à 0, 0,01, 0,05 et 0,1  $\mu$ M de Primextra II magnum pendant 96 heures. La courbe en gras est le témoin.....94

Figure 6.3.13. Relation entre la granulosité et la taille des antennes lors de l'exposition de UTCC 299 au Primextra II magnum à 96 heures. On obtient un  $R^2$  de 0,67.....94

Figure 6.3.14. Relation entre la grosseur des cellules et la taille des antennes lors de l'exposition de UTCC 299 au Primextra II magnum à 96 heures. On obtient un  $R^2$  de 0,63.....95

Figure 6.4.1. Courbe représentant la croissance cellulaire de UTCC 299 exposée à 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra reconstitué sans et avec le phytoprotecteur Benoxacor après 48 heures. Les concentrations de Benoxacor testées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p). Prec signifie Primextra reconstitué .....102

Figure 6.4.2. Courbe représentant la croissance cellulaire de UTCC 299 exposée à 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra reconstitué sans et avec le phytoprotecteur Benoxacor après 96 heures. Les concentrations de Benoxacor testées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p). Prec signifie Primextra reconstitué.....102

Figure 7.1.1. Quantité de chlorophylle *a* par cellules chez UTCC 632 exposée à 0, 0,01 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Aatrex pendant 24 et 96 heures.....119

Figure 7.1.2. Granulosité des cellules de *Microcystis* UTCC 632 exposée pendant 24 heures à 0, 0,01, 0,05 et 0,1  $\mu\text{M}$  d'Aatrex.....121

Figure 7.1.3. Granulosité des cellules de *Microcystis* UTCC 632 exposée pendant 96 heures à 0, 0,01, 0,05 et 0,1  $\mu\text{M}$  d'Aatrex.....121

Figure 7.1.4. Formation d'espèces réactives oxygénées chez UTCC 632 exposée à 0, 0,01, 0,05 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Aatrex pendant 24 heures et 96 heures et mesurée au FACScan grâce à la sonde DCFH-DA (2'-7'-dichlorofluoresceine diacétate). Excitation à 488 nm et l'émission à 525 nm. La détection des ERO se fait en FL-1. Les valeurs sont arbitraires.....122

Figure 7.1.5. Cinétique de fluorescence obtenue au PAM pour UTCC 632 exposée et à 0,1  $\mu\text{M}$  d'Aatrex pendant 96 heures.....123

Figure 7.1.6. Courbe de cinétique rapide obtenue au PEA pour UTCC 632 exposée à 0,1  $\mu\text{M}$  de Aatrex pendant 96 heures. La courbe en gras est le témoin. On remarque peu de hausse du niveau J. ....125

Figure 7.3.1. Quantité de chlorophylle *a* par cellules chez UTCC 632 exposée à 0, 0,01 et 0,1  $\mu$ M de Primextra II magnum pendant 24 et 96 heures. Les valeurs sont ramenées en valeurs relatives.....131

Figure 7.3.2. Granulosité des cellules de *Microcystis* UTCC 632 exposée pendant 24 heures à 0, 0,01, 0,05 et 0,1  $\mu$ M de Primextra II magnum.....132

Figure 7.3.3. Granulosité des cellules de *Microcystis* UTCC 632 exposée pendant 96 heures à 0, 0,01, 0,05 et 0,1  $\mu$ M de Primextra II magnum.....133

Figure 7.3.4. Profil d'absorbance des pigments de UTCC 632 pour le témoin et l'échantillon testé avec 0,1  $\mu$ M de Primextra II magnum après 96 heures. Le trait en gras est le témoin.....134

Figure 7.3.5. Formation d'espèces réactives oxygénées chez UTCC 632 exposé à 0, 0,01, 0,05 et 0,1  $\mu$ M de Primextra II magnum pendant 24 heures et 96 heures et mesurée au FACScan grâce à la sonde DCFH-DA (2'-7'-dichlorofluoresceine diacétate). Excitation à 488 nm et l'émission à 525 nm. La détection des ERO se fait en FL-1. Les valeurs sont arbitraires.....135

Figure 7.3.6. Cinétique de fluorescence obtenue au PAM pour UTCC 632 exposée à 0 et 0,1  $\mu$ M de Primextra II magnum pendant 96 heures.....136

Figure 7.3.7. Courbe de cinétique rapide obtenue au PEA pour UTCC 632 exposée à 0,1  $\mu$ M de Primextra II magnum pendant 96 heures. La courbe en gras est le témoin. On remarque une hausse du niveau J indiquant par ce fait un blocage entre  $Q_A$  et  $Q_B$ .....139

Figure 7.4.1. Courbe représentant la croissance cellulaire de UTCC 632 exposée à 0 et 0,1  $\mu$ M de Primextra reconstitué sans et avec le phytoprotecteur Benoxacor après 48 heures. Les concentrations de Benoxacor testées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p) Les valeurs sont rapportées en valeurs relatives par rapport au témoin. Prec représente le primextra reconstitué .....143

Figure 7.4.2. Courbe représentant la croissance cellulaire de UTCC 632 exposée à 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra reconstitué sans et avec le phytoprotecteur Benoxacor après 96 heures. Les concentrations de Benoxacor testées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p) Les valeurs sont rapportées en valeurs relatives par rapport au témoin. Prec représente le primextra reconstitué .....144

Figure 8.3. Spectres d'absorbances de UTCC 299 et UTCC 632.....163

Figure 8.4. Two-way ANOVA montrant la quantité de chlorophylle *a* par cellule selon les espèces et la concentration de Primextra II magnum.....164



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 4.1. Quelques paramètres biophysiques obtenus grâce au PEA.....	44
Tableau 5.1. Nomenclature IUPAC des herbicides et phytoprotecteur utilisés.....	51
Tableau 5.2. Concentrations testées avec les herbicides Aatrex et Primextra II magnum.....	52
Tableau 5.3. Concentrations testées avec les herbicides Dual et Dual II magnum.....	52
Tableau 5.4. Concentrations testées avec le Primextra reconstitué, le Primextra reconstitué avec une concentration de Benoxacor de 2% (p/p) et, le Primextra reconstitué avec une concentration de Benoxacor de 4% (p/p). B représente Benoxacor.....	53
Tableau 6.1.1. Taux de croissance selon le compte cellulaire, après 96 heures, de UTCC 299 exposée à 0, 0,01, 0,05 et 0,1 $\mu\text{M}$ d'herbicide Aatrex. Les mesures ont été faites au Coulter Counter. Les unités représentent le nombre de fois une population est doublée par jour (dble d <sup>1</sup> ).....	58
Tableau 6.1.2. Quantité de chlorophylle <i>a</i> par volume cellulaire chez UTCC 299 exposée à 0, 0,01 et 0,1 $\mu\text{M}$ de Primextra II magnum pendant 24 et 96 heures.....	59
Tableau 6.1.3. Volume cellulaire de UTCC 299 exposée à 0 et 0,1 $\mu\text{M}$ d'Aatrex pendant 24 heures et 96 heures.....	60
Tableau 6.1.4. Effets de 0,1 $\mu\text{M}$ d'Aatrex sur les diverses voies de dissipation de l'énergie de UTCC 299 exposée pendant 24 heures et 96 heures. É-t signifie écart-type .....	65
Tableau 6.1.5. Effets de 0,1 $\mu\text{M}$ d'Aatrex sur les paramètres biophysiques de UTCC 299 exposée pendant 24 heures et 96 heures. É-t signifie écart-type .....	69

Tableau 6.2.1. Croissance de UTCC 299 selon le compte cellulaire exposée à 0, 0,05 et 0,1 $\mu\text{M}$ Dual magnum et Dual II magnum pendant 4 jours. . Les unités représentent le nombre de fois une population est doublée par jour (dble $\text{d}^{-1}$ ). ....	72
Tableau 6.2.2. Effets de 0 et 0,1 $\mu\text{M}$ de Dual magnum (sans Benoxacor) et de Dual II magnum (avec Benoxacor) sur les diverses voies de dissipation de l'énergie de UTCC 299 exposée pendant 96 heures. La concentration de Benoxacor dans le Dual II magnum est de 4% (p/p). É-t signifie écart-type .....	73
Tableau 6.2.3. Effets de 0 et 0,1 $\mu\text{M}$ de Dual magnum (sans Benoxacor) et de Dual II magnum (avec Benoxacor) sur les paramètres biophysiques de UTCC 299 exposée pendant 96 heures. La concentration de Benoxacor dans le Dual II magnum est de 4% (p/p). É-t signifie écart-type .....	74
Tableau 6.3.1. Taux de croissance selon le compte cellulaire, après 96 heures, de UTCC 299 exposée à 0, 0,01, 0,05 et 0,1 $\mu\text{M}$ de Primextra II magnum. Les mesures ont été faites au Coulter Counter. Les unités représentent le nombre de fois une population est doublée par jour (dble $\text{d}^{-1}$ ). ....	75
Tableau 6.3.2. Quantité de chlorophylle <i>a</i> par volume cellulaire chez UTCC 299 exposée à 0, 0,01 et 0,1 $\mu\text{M}$ de Primextra II magnum pendant 24 et 96 heures.....	77
Tableau 6.3.3. Volume cellulaire de UTCC 299 exposée à 0 et 0,1 $\mu\text{M}$ de Primextra II magnum pendant 24 heures et 96 heures.....	78
Tableau 6.3.4. Effets du Primextra II magnum sur les diverses voies de dissipation de l'énergie de UTCC 299 exposée pendant 24 heures et 96 heures. É-t signifie écart-type.....	91
Tableau 6.3.5. Effets de 0,1 $\mu\text{M}$ de Primextra II magnum sur les paramètres biophysiques de UTCC 299 exposée pendant 24 heures et 96 heures. É-t signifie écart-type .....	95

Tableau 6.4.1. Croissance de UTCC 299 exposée à 0, 0,1  $\mu$ M Aatrex, 0,1  $\mu$ M Aatrex avec benoxacor 2% (p/p) et 0,1  $\mu$ M Aatrex avec benoxacor 4% (p/p) selon le dénombrement de cellules avec le Coulter Counter Multisizer III. B signifie Benoxacor. Les unités représentent le nombre de fois une population est doublée par jour (dble d<sup>-1</sup>). .....101

Tableau 6.4.2. Effets de 0 et 0,1  $\mu$ M de Primextra reconstitué avec et sans le phytoprotecteur Benoxacor sur le volume cellulaire de UTCC 299 exposée pendant 24 et 96 heures. Un témoin exposé au solvant méthanol a aussi été utilisé afin de discriminer l'effet de celui-ci sur les résultats. PR signifie Primextra reconstitué. Les concentrations de Benoxacor testées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p). .....104

Tableau 6.4.3. Effets de 0 et 0,1  $\mu$ M de Primextra reconstitué avec et sans le phytoprotecteur Benoxacor sur les diverses voies de dissipation de l'énergie de UTCC 299 exposée pendant 24 et 96 heures. PR signifie Primextra reconstitué. Les concentrations de Benoxacor ajoutées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p). La ligne en grisé est la reconstitution de Primextra avec une concentration de Benoxacor de 2% (p/p). É-t signifie écart-type .....107

Tableau 6.4.4. Variation des effets de 0 et 0,1  $\mu$ M de l'herbicide reconstitué Primextra avec et sans le phytoprotecteur Benoxacor sur UTCC 299 exposée pendant 24 et 96 heures. Les valeurs sont représentées en pourcentage par rapport au témoin. PR signifie Primextra reconstitué. Les concentrations de Benoxacor ajoutées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p). La ligne en grisé est la reconstitution de Primextra avec une concentration de Benoxacor de 2% (p/p). .....108

Tableau 6.4.5. Effets de 0 et 0,1  $\mu$ M de Primextra reconstitué avec et sans le phytoprotecteur Benoxacor sur les paramètres biophysiques de UTCC 632 exposée pendant 24 et 96 heures. PR signifie Primextra reconstitué. Les concentrations de Benoxacor ajoutées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p). La ligne en grisé est la reconstitution de Primextra avec une concentration de Benoxacor de 2% (p/p). É-t signifie écart-type .....109

Tableau 6.4.6. Variation des effets de 0 et 0,1  $\mu$ M de l'herbicide reconstitué Primextra avec et sans le phytoprotecteur Benoxacor sur UTCC 299 exposée pendant 24 et 96 heures. Les valeurs sont représentées en pourcentage par rapport au témoin. PR signifie Primextra

reconstitué. Les concentrations de Benoxacor ajoutées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p). La ligne en grisé est la reconstitution de Primextra avec une concentration de Benoxacor de 2% (p/p)..... 110

Tableau 6.5.1. Détermination du taux de croissance de UTCC 299 exposée à du Benoxacor 2% (p/p) et 0,1  $\mu$ M de Aatrex plus 2% de Benoxacor (p/p) selon le dénombrement de cellules avec le Coulter Counter Multisizer III. B signifie Benoxacor et AA est l'Aatrex. . Les unités représentent le nombre de fois une population est doublée par jour (dble d<sup>-1</sup>)..... 112

Tableau 6.5.2. Volumes cellulaires lorsque UTCC 299 est exposée au phytoprotecteur Benoxacor 2% (p/p) seul et conjointement à 0,1 d'Aatrex pendant 96 heures. Les résultats sont en valeurs absolues..... 113

Tableau 6.5.3. Effets du Benoxacor seul (2% (p/p)) et avec 0,1  $\mu$ M d'Aatrex sur les voies de dissipation de l'énergie chez UTCC 299 exposée pendant 96 heures. B signifie Benoxacor et AA l'Aatrex. É-t signifie écart-type ..... 114

Tableau 6.5.4. Effets du Benoxacor seul (2% (p/p)) et avec 0,1  $\mu$ M d'Aatrex sur les paramètres biophysiques de UTCC 299 exposée pendant 96 heures. B signifie Benoxacor et AA est l'Aatrex..... 116

Tableau 7.1.1. Taux de croissance, selon le comptage cellulaire, après 96 heures de UTCC 632 exposée à 0, 0,01, 0,05 et 0,1  $\mu$ M de Aatrex. Les unités représentent le nombre de fois une population est doublée par jour (dble d<sup>-1</sup>) ..... 118

Tableau 7.1.2. Quantité de chlorophylle *a* par volume cellulaire chez UTCC 632 exposée à 0, 0,01 et 0,1  $\mu$ M de Aatrex pendant 24 et 96 heures..... 119

Tableau 7.1.3. Volume cellulaire de UTCC 632 exposée à 0 et 0,1  $\mu$ M de Aatrex pendant 24 heures et 96 heures..... 120

Tableau 7.1.4. Effets de l'Aatrex sur les diverses voies de dissipation de l'énergie de UTCC 632 exposée pendant 24 heures et 96 heures. É-t signifie écart-type .....	124
Tableau 7.1.5. Effets de l'Aatrex sur les paramètres biophysiques de UTCC 632 exposé pendant 24 heures et 96 heures. É-t signifie écart-type .....	126
Tableau 7.2.1. Croissance de UTCC 632 exposée à 0, 0,05 et 0,1 $\mu$ M de Dual magnum et Dual II magnum pendant 4 jours. Les unités représentent le nombre de fois une population est doublée par jour (dble d <sup>-1</sup> ).....	127
Tableau 7.2.2. Effets de 0,1 $\mu$ M de Dual magnum (sans Benoxacor) et de Dual II magnum (avec Benoxacor) sur les diverses voies de dissipation de l'énergie de UTCC 632 exposée pendant 96 heures. La concentration de Benoxacor dans le Dual II magnum est de 4% (p/p). É-t signifie écart-type.....	128
Tableau 7.2.3. Effets de 0,1 $\mu$ M de Dual magnum (sans Benoxacor) et de Dual II magnum (avec Benoxacor) sur les paramètres biophysiques de UTCC 632 exposée pendant 96 heures. La concentration de Benoxacor dans le Dual II magnum est de 4% (p/p). É-t signifie écart-type.....	129
Tableau 7.3.1. Taux de croissance, selon le comptage cellulaire, après 96 heures de UTCC 632 exposée à 0, 0,01, 0,05 et 0,1 $\mu$ M de Primextra II magnum. Les mesures ont été faites au Coulter Counter. Les unités représentent le nombre de fois une population est doublée par jour (dble d <sup>-1</sup> ).....	130
Tableau 7.3.2. Quantité de chlorophylle <i>a</i> par volume cellulaire chez UTCC 632 exposée à 0, 0,01 et 0,1 $\mu$ M de Primextra II magnum pendant 24 et 96 heures.....	131
Tableau 7.3.3. Volume cellulaire de UTCC 299 exposée à 0 et 0,1 $\mu$ M de Primextra II magnum pendant 24 heures et 96 heures.....	132

Tableau 7.3.4. Effets du Primextra II magnum sur les diverses voies de dissipation de l'énergie de UTCC 632 exposée pendant 24 heures et 96 heures. É-t signifie écart-type .....	137
---	-----

Tableau 7.3.5. Effets du Primextra II magnum sur les paramètres biophysiques de UTCC 632 exposée pendant 24 heures et 96 heures. É-t signifie écart-type.....	140
---	-----

Tableau 7.4.1. Croissance de UTCC 632 exposée à 0 et 0,1 $\mu$ M de Primextra reconstitué sans Benoxacor, 0,1 $\mu$ M de Primextra reconstitué avec Benoxacor 2% (p/p) et 0,1 $\mu$ M de Primextra reconstitué avec Benoxacor 4% (p/p) selon le dénombrement de cellules avec le Coulter Counter Multisizer III. B signifie Benoxacor. Les unités représentent le nombre de fois une population est doublée par jour (dble d <sup>-1</sup> ).....	144
---	-----

Tableau 7.4.2. Effets de 0 et 0,1 $\mu$ M de Primextra reconstitué avec et sans le phytoprotecteur Benoxacor sur le volume cellulaire de UTCC 632 exposé pendant 24 et 96 heures. PR signifie Primextra reconstitué. Les concentrations de Benoxacor testées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p).....	145
--	-----

Tableau 7.4.3. Effets de 0 et 0,1 $\mu$ M de Primextra reconstitué avec et sans le phytoprotecteur Benoxacor sur les paramètres biophysiques de UTCC 632 exposée pendant 24 et 96 heures. PR signifie Primextra reconstitué. Les concentrations de Benoxacor ajoutées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p). La ligne en grisé est la reconstitution correspondant au Primextra II magnum. É-t signifie écart-type.....	146
--	-----

Tableau 7.4.4. Variation des effets de 0 et 0,1 $\mu$ M de l'herbicide reconstitué Primextra avec et sans le phytoprotecteur Benoxacor sur UTCC 632 exposée pendant 24 et 96 heures. Les valeurs sont représentées en pourcentage par rapport au témoin. PR signifie Primextra reconstitué. Les concentrations de Benoxacor ajoutées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p). La ligne en grisé est la reconstitution correspondant au Primextra II magnum. Les valeurs présentées sont calculées par rapport au témoin.....	147
---	-----

Tableau 7.4.5. Effets de 0 et 0,1 $\mu$ M de Primextra reconstitué avec et sans le phytoprotecteur Benoxacor sur les diverses voies de dissipation de l'énergie de UTCC 632 exposée pendant 24	
--	--

et 96 heures. PR signifie Primextra reconstitué. Les concentrations de Benoxacor ajoutées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p). La ligne en grisé est la reconstitution correspondant au Primextra II magnum. É-t signifie écart-type.....149

Tableau 7.4.6. Variation des effets de 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  de l'herbicide reconstitué Primextra avec et sans le phytoprotecteur Benoxacor sur UTCC 632 exposée pendant 24 et 96 heures. Les valeurs sont représentées en pourcentage par rapport au témoin. PR signifie Primextra reconstitué. Les concentrations de Benoxacor ajoutées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p). La ligne en grisé est la reconstitution correspondant au Primextra II magnum.....150

Tableau 7.5.1. Détermination du taux de croissance de UTCC 632 exposée à du Benoxacor 2% (p/p) et 0,1  $\mu\text{M}$  de Aatrex plus 2% de Benoxacor (p/p) selon le dénombrement de cellules avec le Coulter Counter Multisizer III. B signifie Benoxacor et AA est l'Aatrex. Les unités représentent le nombre de fois une population est doublée par jour (dbled<sup>1</sup>).....151

Tableau 7.5.2. Volumes cellulaires lorsque UTCC 632 est exposée au phytoprotecteur Benoxacor 2% (p/p) seul et conjointement à 0,1 d'Aatrex pendant 96 heures AA représente l'aatrex et Ben est le benoxacor.....152

Tableau 7.5.3. Effets du Benoxacor seul (2% (p/p)) et avec 0,1  $\mu\text{M}$  d'Aatrex sur les voies de dissipation de l'énergie chez UTCC 632 exposée pendant 96 heures. B signifie Benoxacor et AA est l'Aatrex. É-t signifie écart-type .....153

Tableau 7.5.4. Effets du Benoxacor seul (2% (p/p)) et avec 0,1  $\mu\text{M}$  d'Aatrex sur les paramètres biophysiques de UTCC 632 exposée pendant 96 heures. B signifie Benoxacor et AA est l'Aatrex.....155

Tableau 8.1.1. Variation des paramètres de cinétiques de fluorescence lorsque comparés aux contrôles chez UTCC 299 exposée à 0,1  $\mu\text{M}$  d'Aatrex, un mélange de 0,1  $\mu\text{M}$  d'Aatrex et de Benoxacor 2% (p/p) et du Primextra reconstitué avec Benoxacor 2% (p/p) pendant 96 heures. AA est Aatrex, B est Benoxacor et PR est Primextra reconstitué.....159

Tableau 8.1.2. Variation des paramètres biophysiques lorsque comparés aux contrôles chez UTCC 299 exposée à 0,1 $\mu\text{M}$ d'Aatrex, un mélange de 0,1 $\mu\text{M}$ d'Aatrex et de Benoxacor 2% (p/p) et du Primextra reconstitué avec Benoxacor 2% (p/p) pendant 96 heures. AA est Aatrex, B est Benoxacor et PR est Primextra reconstitué.....	160
--	-----

Tableau 8.2.1. Variation des paramètres de cinétiques de fluorescence lorsque comparés aux contrôles chez UTCC 632 exposée à 0,1 $\mu\text{M}$ d'Aatrex, un mélange de 0,1 $\mu\text{M}$ d'Aatrex et de Benoxacor 2% (p/p) et du Primextra reconstitué avec Benoxacor 2% (p/p) pendant 96 heures. AA est Aatrex, B est Benoxacor et PR est Primextra reconstitué.....	161
---	-----

Tableau 8.2.2. Variation des paramètres biophysiques lorsque comparés aux contrôles chez UTCC 632 exposée à 0,1 $\mu\text{M}$ d'Aatrex, un mélange de 0,1 $\mu\text{M}$ d'Aatrex et de Benoxacor 2% (p/p) et du Primextra reconstitué avec Benoxacor 2% (p/p) pendant 96 heures. AA est Aatrex, B est Benoxacor et PR est Primextra reconstitué.....	162
--	-----



## LISTE DES SYMBOLES

$A_{\max}$ =absorbance maximale

Å=angstrom

ADN=Acide désoxyribonucléique

ATP=adénosine triphosphate

C=carbone

CAS= Chemical Abstracts Service

CDO=complexe de dégagement d'oxygène

Chl=chlorophylle

Da=dalton

DCMU= 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée

E=einstein

FL=fluorescence light

Fs= steady state fluorescence

g=gramme

G=«growth»; phase de croissance cellulaire

$h$ =constante de Planck;  $6,63 \cdot 10^{-34}$  joules\*seconde

h=heure

IUPAC= International Union of Pure and Applied Chemistry

k=kilo

L=litre

m=mètre

M=molaire

mg=milligramme

mL=millilitre

moy=moyenne

N=normale

NADPH=Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

nm=nanomètre

NPQ=non-photochemical quenching

P680=centre réactionnel du photosystème II

P700= centre réactionnel du photosystème I

PCC=Pasteur culture collection

Ph=phéophytine

Pheo=phéophytine

$Q_A$ =quinone A

$Q_B$ =quinone B

$q_p$ =quenching photochimique

$q_N$ =quenching non-photochimique

s=seconde

u.a.=unité arbitraire

u.r.=unité relative

UQF=unquenched fluorescence

UTCC=University of Toronto culture collection

UTEX= University of Texas culture collection

p/p=concentration poids/poids

$\mu$ =micro

$\eta$ =nu, fréquence

$\lambda$ =longueur d'onde

$\Phi$ =phi

## RÉSUMÉ

L'agriculture intensive utilise de grandes quantités d'herbicides afin de contrer la prolifération des mauvaises herbes. On retrouve ces divers herbicides dans l'environnement, que ce soit dans les sols ou dans les cours d'eau. Chacun de ces herbicides peut avoir un effet délétère sur les organismes aquatiques. Certains de ceux-ci, tel l'atrazine, ont été l'objet de nombreuses études sur leurs effets sur les organismes vivants. On sait, par ailleurs, que ces herbicides peuvent dérégler l'équilibre du biote aquatique. Il faut toutefois se rappeler que plusieurs types d'herbicides sont utilisés simultanément et à de nombreuses reprises au cours d'une saison créant ainsi un mélange potentiellement très toxique pour les différents organismes non-cibles. Ces herbicides peuvent interagir de nombreuses façons entre eux, que ce soit de manière synergique, antagoniste, additive.

Les cyanobactéries sont appelées couramment algues bleu-vert et se retrouvent dans les milieux eutrophes riches en phosphates et en nitrates. L'agriculture, de par son utilisation massive d'engrais, permet la création de milieux particulièrement propices à l'éclosion de floraisons de cyanobactéries qui forment ces tapis verdâtres et gluants sur les cours d'eau, les rendant nauséabonds et impropres à la baignade. De plus, certaines souches produisent, de surcroît, des toxines qui peuvent être délétères pour les organismes vivants. Ces toxines peuvent parfois se retrouver en quantité suffisante dans l'eau potable et affecter la santé humaine.

Peu d'études ont été faites sur les effets de xénobiotiques, tels que des herbicides, sur la photosynthèse et la physiologie des cyanobactéries. Comment ces herbicides et leurs mélanges affectent-ils la cyanobactérie qu'on retrouve partout dans le monde, *Microcystis aeruginosa*? Nous avons utilisé deux souches de *Microcystis aeruginosa*, l'une produisant la toxine hépatotoxique appelée microcystine (UTCC 299), l'autre ne la produisant pas (UTCC 632). Lors de cette étude, nous avons testé les effets individuels de divers herbicides commerciaux (atrazine, métolachlore), d'un additif (*safener* ou phytoprotecteur) appelé Benoxacor et de divers mélanges de ces substances. Nous avons étudié les effets de ces substances sur la photosynthèse grâce au PAM et au PEA, appareils utilisant la fluorescence comme outil de mesure afin de déterminer comment est utilisée l'énergie lumineuse servant à la photosynthèse et comment elle est dissipée à travers diverses voies de dissipations énergétiques. Nous avons aussi utilisé la cytométrie en flux afin de déterminer les effets de ces xénobiotiques sur la grosseur et la granulosité des cellules en plus de mettre en évidence la formation d'espèces réactives oxygénées. Nous avons aussi extraits les pigments chlorophylliens afin de vérifier les effets des produits utilisés sur ceux-ci.

Ce qu'il ressort de cette étude est le fait que l'atrazine est un facteur majeur de la toxicité dans les mélanges tandis que le métolachlore n'a pas d'effets significatifs. De plus, le phytoprotecteur Benoxacor présente aussi une forte toxicité et rehausse les effets délétères lorsque ajouté dans un mélange. Il y a production d'espèces réactives oxygénées en présence d'atrazine. Les cellules voient leur physiologie changée et la chlorophylle *a* cellulaire de UTCC 299 est fortement affectée par la présence des herbicides. L'atrazine et le Benoxacor interagissent ensemble et leur mélange augmente la toxicité générale du mélange. Les antennes et les pigments chlorophylliens sont les éléments les plus affectés et altérés par les substances testées. La physiologie de UTCC 299 est nettement plus affectée par l'atrazine et le Benoxacor que UTCC 632.

### Mots-clés

Herbicides, interaction, PEA, PAM, cyanobactéries, chlorophylle, phytoprotecteur, *safener*, espèces réactives oxygénées.

## INTRODUCTION

Problématique agricole.

L'utilisation intensive des herbicides a eu pour conséquence leur grande présence dans l'environnement. En dépit des réglementations de plus en plus sévères au niveau de l'application des pesticides dans le domaine de l'agriculture, les systèmes aquatiques sont de plus en plus pollués par divers produits chimiques, ce qui entraîne leurs dérèglements. Les produits phytosanitaires qui se retrouvent par lessivage des sols dans le biote aquatique peuvent affecter de façon négative les organismes aquatiques (Gustavson et Wangberg, 1995; Spawn *et al.*, 1997; Seguin *et al.*, 2001; Lockert *et al.*, 2006) et agir sur l'équilibre d'une communauté aquatique en déterminant quel taxon ou quelle espèce est en mesure de devenir l'organisme dominant dans l'écosystème (Lürling et Roessink, 2006). Les plantes aquatiques non-cibles sont exposées de multiples façons et sur de longues périodes aux herbicides car tous ces produits toxiques épanchés de façon individuelle se retrouvent finalement tous réunis dans les systèmes aquatiques. De plus, les effets délétères des pesticides sur les espèces microbiennes ou planctoniques peuvent entraîner des impacts négatifs aux niveaux trophiques supérieurs. Par exemple, un changement de la composition lipidique, de la qualité nutritive du phytoplancton ou un changement dans la composition de la communauté phytoplanctonique peut affecter la vitesse de croissance des consommateurs zooplanctoniques (Ahlgren *et al.*, 1990). En effet, une baisse de la présence de certains de ces organismes qui servent de nutriments pour d'autres espèces peut être dommageable pour les espèces consommatrices. On se rend de plus en plus compte qu'il est impératif de tester les effets des mélanges d'herbicides afin de prédire les effets écotoxicologiques sur les écosystèmes aquatiques qui recueillent les lixiviats provenant des épandages agricoles (Cairns, 1983; Fairchild, 1994; Cedergreen et Streibig, 2005).

### *Microcystis aeruginosa*

Les cyanobactéries, ou algues bleu-vert, sont des procaryotes (règne des Monères) classifiés comme bactéries Gram-négatives possédant de la chlorophylle *a* et capables de photosynthèse. Les floraisons ou efflorescences (blooms) de cyanobactéries sont très souvent observées dans

des eaux eutrophes. Certaines conditions de nutriments, pH, lumière peuvent affecter la création de ces blooms tout comme la présence de zooplancton brouteur et la compétition avec d'autres organismes photo-autotrophes. L'augmentation de l'eutrophisation anthropique des cours d'eau provenant principalement de l'agriculture crée des conditions propices à l'éclosion des floraisons de cyanobactéries qui infestent les plans d'eau douce et sont des indicateurs de mauvaise qualité de l'eau. De plus, ces floraisons sont à même de dérégler l'équilibre du biote aquatique (Abe *et al.*, 1996; Casanova *et al.*, 1999 ; Ghadouani *et al.*, 2003). *Microcystis aeruginosa* est une cyanobactérie créant des efflorescences et qui est trouvée dans le monde entier. Certaines souches de *Microcystis aeruginosa* produisent des heptapeptides cycliques hépatotoxiques appelées microcystines qui peuvent être délétères aux organismes aquatiques et même pour les humains lorsque cette toxine se retrouve en trop grande quantité dans l'eau potable (Falconer, 1999 ; Codd, 2000; Carmichael *et al.*, 2001).

#### Effets des herbicides sur la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa*.

Plusieurs études sont faites sur les effets des herbicides sur différentes espèces de phytoplancton et sur les dérèglements du biote aquatique qui peuvent en découler (DeNoyelles *et al.*, 1982 ; Gustavson et Wangberg, 1995 ; Lürling et Roessink, 2006). La plupart des études faites jusqu'à maintenant le sont principalement sur des algues, mais peu concernent les cyanobactéries. Les cyanobactéries sont habituellement testées seules ou en études comparatives avec d'autres espèces d'algues (Day et Hodges, 1996 ; Fairchild *et al.*, 1998; Spawn *et al.*, 1997 ; Lockert *et al.*, 2006; Lürling et Roessink, 2006). Des études sur les effets des toxines de cyanobactéries sur d'autres espèces de cyanobactéries ont aussi été faites (Lam et Silvester, 1979 ; Gleason et Paulson, 1981; Flores et Wolk, 1983). Les études portant sur *Microcystis* sont surtout faites en relation avec la production de la toxine et de ses effets sur les autres organismes aquatiques environnants (Lam et Silvester, 1979 ; Mason *et al.*, 1982; Shlegel *et al.*, 1998; Ghadouani *et al.*, 2003). Une autre approche est abordée dans ce travail: Quel est l'effet de xénobiotiques tels que des herbicides sur la photosynthèse et la physiologie de *Microcystis aeruginosa*? De plus, nous avons comparé les effets des herbicides entre les souches d'une même espèce afin de déterminer s'il y a des différences de sensibilité *inter-souches* et si c'est le cas, quelle en est l'ampleur. On déterminera donc si la sensibilité varie entre des souches toxiques et non-toxiques de l'espèce *Microcystis aeruginosa*.

La plupart des études faites sur les effets des herbicides sur les plantes supérieures ainsi que sur les algues sont faites avec des substances herbicides pures. Un herbicide commercial est un mélange en soi : agents tensio-actifs et débullants (anti-foaming), protecteurs et autres additifs. Dans cette étude, les effets des herbicides commerciaux Aatrex (atrazine), Dual magnum (métolachlore et phytoprotecteur Benoxacor) et Primextra II magnum (un mélange d'atrazine et de métolachlore ainsi que de l'agent protecteur Benoxacor) sur les paramètres photosynthétiques de *M. aeruginosa* ont été analysés. De plus, les effets de ces herbicides sur la physiologie de cette cyanobactérie (contenu en pigments, formation d'espèces réactives oxygénées (ERO), grosseur des cellules) ont aussi été analysés. Nous avons étudié les effets de ces herbicides de manière individuelle et en mélange afin de déterminer si le mélange peut être plus toxique et affecter plus fortement la photosynthèse. Les concentrations utilisées sont celles que nous pouvons retrouver couramment dans l'environnement. Les effets de l'agent protecteur Benoxacor sont aussi étudiés afin de voir s'il est un agent impliqué dans les variations de toxicité.

Différentes techniques fluorométriques (Pulse Amplitude Modulated ou PAM et Plant Efficiency Analyser ou PEA) ont été utilisées afin de tester les effets de ces différentes substances sur le processus photosynthétique de *Microcystis aeruginosa*. Le PAM qui mesure l'activité photosynthétique au niveau du photosystème II (PSII) nous indique via des paramètres de fluorescence l'état du processus (Schreiber *et al.*, 1986; Bolhàr-Nordenkamp *et al.*, 1989; Genty *et al.*, 1989). Le PEA, quant à lui, nous informe via des paramètres biophysiques comment se déroule la circulation électronique dans le PSII et de son   tat. Ces techniques sont non-invasives, sensibles et très couramment utilisées afin de déterminer les effets des polluants sur le processus photosynthétique (Conrad *et al.*, 1993; El Jay *et al.*, 1997; Juneau et Popovic, 1999; Marwood *et al.*, 1999).

Le chapitre 1 traite de la problématique agricole et des mécanismes d'action des produits herbicides utilisés dans la pratique agricole tandis que le chapitre 2 met en lumière les effets de ces pratiques sur le biote aquatique. Le chapitre 3 dépeint le processus de la photosynthèse et décrit la structure des phycobilisomes qui servent à capter l'énergie lumineuse. Le chapitre 4 explique brièvement la théorie qui sous-tend les tests fluorométriques utilisés et présente en quoi l'utilisation du phénomène de la fluorescence, qui est une des voies des divers types de dissipations énergétiques, peut permettre de démontrer la qualité du processus photosynthétique et le quantifier. Le chapitre 5 présente la méthode de travail. Dans le chapitre 6, les résultats obtenus avec chacun des herbicides pour la souche toxique seront exposés et discutés et il en

sera de même pour la souche non-toxique dans le chapitre 7. Le chapitre 8 propose les résultats de manière résumée et comparative. Le chapitre 9 consiste en une conclusion.

## CHAPITRE I

### I. HERBICIDES

#### I.1. Présence des herbicides dans le milieu.

Au Québec, les surfaces consacrées à la culture du maïs se sont accrues entre 1996 et 2001 d'environ 29% et la culture du soya faite en association ou en rotation avec la culture de maïs est elle aussi en croissance (Statistique Canada, 1996; Statistique Canada, 2001). Ces deux types de cultures utilisent la plus grande proportion des herbicides vendus au Québec. Les substances herbicides les plus souvent utilisées, seules ou en mélange commerciaux (ex.: AATREX, MARKSMAN, LADDOK, DUAL ET PRIMEXTRA), et retrouvées dans les rivières sont l'atrazine et le métolachlore (Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 2002). Généralement, les résultats découlant des observations faites au Québec concordent avec ce qui peut être observé dans d'autres régions agricoles du monde où le maïs et le soya sont cultivés. Dans le programme NAWQA (National water quality assesement) de l'United States Geological survey (USGS), 162 stations de mesures en rivières situées dans 49 des plus importants bassins versants des États-Unis ont été échantillonnées entre 1992-2001 pour la détection de la présence de pesticides. Des données sont disponibles pour cette période et celles-ci mettent en évidence la présence de 76 pesticides et 7 de leurs produits de dégradation (Martin *et al.*, 2003) dans les différentes rivières testées. Ce qui ressort nettement de cette étude est la forte présence d'atrazine (90,44%), de son produit de dégradation, le dééthyl-atrazine (82,11%), et de métolachlore (82,74%) dans les échantillons analysés. Les données obtenues dans le rapport de Martin *et al.*, (2003) montre une tendance semblable aux rapports précédents déjà faits aux États-Unis par Larson *et al.*, 1999 et Clark et Goolsby, 2000. Les mêmes tendances ont été aussi observées au Québec (Giroux *et al.*, 2006), soit une forte présence d'atrazine et de métolachlore dans les rivières. Toutefois, les concentrations d'atrazine et de métolachlore détectées aux États-Unis étaient plus élevées qu'au Québec. Le USGS rapportait des concentrations maximales d'atrazine de 201 µg/L et des concentrations de métolachlore de 78 µg/L tandis que l'étude de Giroux *et al.*, (2006) rapporte que de l'atrazine pouvait parfois être retrouvé dans les rivières du Québec à des concentrations maximales de 62 µg/L tandis que le métolachlore pouvait être détecté à des concentrations



maximales de 6,9 µg/L. Maguire et Tkacz, (1993) rapportaient dans une étude faite en 1986 et 1987 sur la présence de pesticides dans la rivière Yamaska et certains de ses affluents que les herbicides les plus couramment détectés étaient l'atrazine et le métolachlore.

Dans les régions où l'atrazine est très utilisé, il est l'herbicide principal trouvé dans les eaux de surface et les puits. L'atrazine est positionné par Agriculture Canada au premier rang sur une liste de 83 pesticides risquant de contaminer les eaux souterraines (McRae, 1989). Des cas de contamination ont été recensés en Colombie-Britannique (McRae, 1989), en Nouvelle-Écosse, à l'île du Prince-Édouard, au Québec et en Saskatchewan (Hiebsch, 1988). Dans le rapport fourni par Giroux *et al.*, (2006), les produits détectés dans plus de 50% des échantillons prélevés en 2002, 2003 et 2004 étaient l'atrazine (99,5%), le métolachlore (99,3%), le dicamba (85,7%), le bentazone (79,9%) et le diméthénamide (53,7%). Les produits de dégradation de l'atrazine, le dééthyl-atrazine (DEA) et le déisopropyl-atrazine (DIA) pouvaient être détectés respectivement dans 92,4% et 29,9% des échantillons analysés. Les concentrations d'atrazine se trouvaient dans plusieurs cas à des niveaux bien au-dessus du critère de qualité pour la vie aquatique qui se trouve être de 2 µg/L (Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 2005) tandis que les concentrations de métolachlore atteignaient des concentrations très proches de celles jugées acceptables (8µg/L) pour respecter le critère de qualité de la vie aquatique (Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 2005). Les résultats rapportés dans le rapport de Giroux *et al.*, (2006) montrent que les concentrations d'atrazine détectées dépassent la valeur du critère de qualité de l'eau pour la protection de la vie aquatique dans 13% à 19% des échantillons pris dans la rivière Chibouet, 2,5 % à 9% des échantillons prélevés dans la rivière des Hurons, 2,5% à 12,5% des échantillons prélevés dans la rivière St-Zéphirin et 2,5% à 10% des échantillons sélectionnés dans la rivière St-Régis. Il était, de plus, fréquent de trouver de 6 à 7 herbicides en même temps dans l'eau des rivières testées. Dans certains cas, on pouvait détecter dans les échantillons des mois de juin et de juillet la présence simultanée de 10 herbicides. Même s'ils sont moins fréquents qu'avant, des dépassements des critères de qualité de l'eau pour la protection de la vie aquatique se produisent encore dans le cas de l'atrazine dans 6% à 13% des échantillons analysés (Giroux *et al.*, 2006).

Le métolachlore était retrouvé dans 125 des 917 échantillons pris dans des stations de traitement des eaux dans les provinces Atlantiques (1985-1986), au Québec (1984-1985), en Ontario (1979-1986) et en Alberta (1986) (Hiebsch, 1988). La concentration maximale trouvée dans une réserve d'eau en Ontario fut de 1 800 µg/L (Hiebsch, 1988). Dans une étude du USGS (United

States Geological survey) (Blomquist *et al.*, 2001), on remarque que, tout comme au Québec, l'atrazine et le métolachlore font partie des pesticides les plus fréquemment détectés dans l'eau des réseaux de distribution d'eau potable de 12 états des États-Unis. Pour ce qui est de l'atrazine et du métolachlore, les concentrations maximales trouvées en 1999 et 2000 dans ces réseaux étaient plus élevées que celles mesurées au Québec entre 2001 et 2004. Aux États-Unis, les concentrations maximales d'atrazine mesurées dans l'eau potable étaient de 2,4 µg/L et celles de métolachlore étaient de 0,66 µg/L (Blomquist *et al.*, 2001) tandis qu'au Québec (Giroux *et al.*, 2006) les concentrations maximales respectives d'atrazine et de métolachlore étaient de 0,9 µg/L et 0,45µg/L.

## 1.2. Mode d'action des produits phytosanitaires utilisés couramment.

Plusieurs procédés métaboliques des plantes sont inhibés par les herbicides et le photosystème II (PSII) est généralement la cible première de ces produits. Les ingrédients actifs de plusieurs herbicides agissent sur le photosystème II, un complexe protéique inséré dans la membrane des thylacoïdes et lié directement au phénomène de la photosynthèse. Entre autres cibles possibles il y a l'*acétolactate synthase* (ALS) et la *protoporphyrinogene IX oxydase* (Protox) (Cole *et al.*, 2000). L'atrazine (un s-triazine), le DCMU (un phényl-urée) ainsi que le bentazone (benzothiadiazine) sont des exemples d'herbicides affectant le PSII (Oettmeier *et al.*, 1982 ; Geoffroy *et al.*, 2002).

L'atrazine (6-chloro-*N*-éthyl-*N*9-(1-méthyléthyl)-1,3,5-triazine-2,4,diamine) est un herbicide utilisé très couramment (Larson *et al.*, 1999 ; Clark et Goolsby, 2000 ; Martin *et al.*, 2003) qui contrôle les mauvaises herbes à feuilles larges dans les cultures de maïs et de sorgho. Il est absorbé par les racines et les feuillages, se déplace vers le haut de la plante puis s'accumule au bord des feuilles et aux points de croissance (Syngenta Canada). L'atrazine, inhibe le transport des électrons entre l'accepteur primaire ( $Q_A$ ) et l'accepteur secondaire ( $Q_B$ ) (Jursinic et Stemler, 1983), empêchant ainsi le processus de la photosynthèse de se produire. Ce blocage du transport des électrons crée du stress oxydant, provoquant la photo-oxydation de la chlorophylle (Rutherford et Krieger-Liszkay, 2001).

Les organites qui possèdent une forte activité métabolique ou qui ont un taux élevé de transport d'électrons, tels les chloroplastes et la mitochondrie, sont des sources majeures de production d'espèces réactives oxygénées (ERO) chez les plantes (Mittler *et al.*, 2004). Dans les

chloroplastes, la source principale de production de ERO provient des pigments antennaires et de la réaction de Mehler (photoréduction de  $O_2$  au niveau du photosystème I) (Takahashi et Asada, 1982).

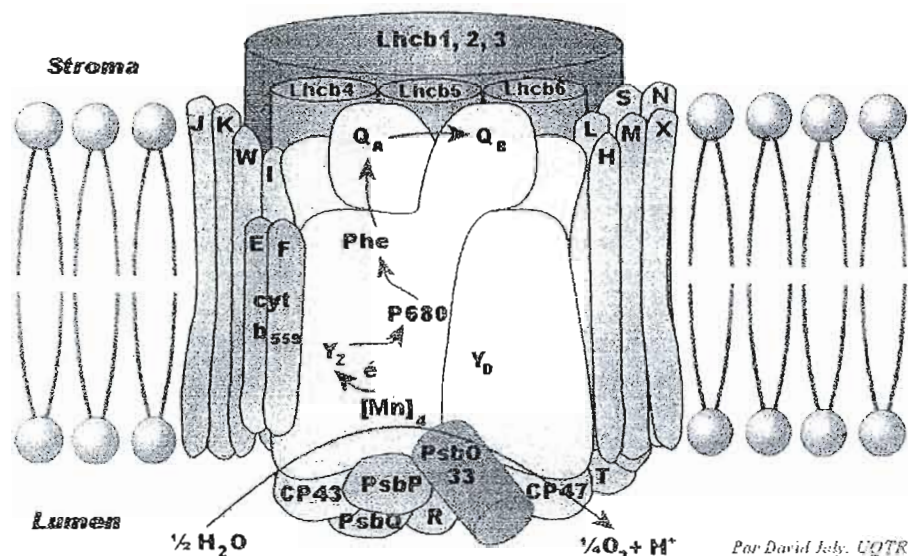


Figure 1.1. Photosystème II.

[www.uqtr.ca/labcarpentier/fr/recherche.htm](http://www.uqtr.ca/labcarpentier/fr/recherche.htm).

Les stress environnementaux qui dérèglent l'équilibre entre la captation de la lumière et l'utilisation de l'énergie allongent la durée de vie de la  $^1\text{Chl}^*$  (état singulet) augmentant ainsi la probabilité que cette forme de la chlorophylle se transforme en  $^3\text{Chl}^*$  (état triplet) (van Mieghem *et al.*, 1995; Noguchi, 2002). Les électrons dans l'état singulet de la chlorophylle peuvent se «rephaser», c'est-à-dire changer l'orientation de leur spin, et créer  $^3\text{Chl}^*$  d'énergie plus basse et qui a une durée de vie plus longue que  $^1\text{Chl}^*$  (Rutherford et Krieger-Liszkay, 2001). L'état triplet ( $^3\text{Chl}^*$ ) réagit plus rapidement avec  $^3O_2$  produisant  $^1O_2^*$  et induit ainsi un stress oxydant transmis par la chlorophylle. En fait, l'organisme photosynthétique soumis au stress environnemental serait détruit par la formation de radicaux libres induits par la lumière. Plus précisément, la toxicité requiert la lumière et implique la génération de l'espèce réactive

$^1\text{O}_2$  (Rutherford et Krieger-Liszkay, 2001). Rutherford et Krieger-Liszkay, (2001) affirment que la liaison de certains herbicides influence les propriétés oxydo-réductrices de la quinone A ( $\text{Q}_\text{A}$ ) et que certains d'entre eux (herbicides de type phénolique) en abaissant le potentiel rédox de  $\text{Q}_\text{A}$ , diminuent l'écart énergétique entre  $\text{P680}^{++}\text{Q}_\text{A}^{--}$  et  $\text{P680}^{++}\text{Ph}^{--}$  ceci permettant un retour en arrière des électrons, ce qui entraîne la formation de la paire radicalaire  $\text{P680}^{+}\text{Ph}^{\cdot-}$ . Le processus de recombinaison de charge entraîne une réduction du centre réactionnel à nouveau, ce qui entraîne la formation de  $^3\text{P680}$ .  $^3\text{P680}$  a une longue durée de vie et est capable de faire passer  $\text{O}_2$  de sa forme triplet relativement stable à sa forme singulet réactive et toxique (Lendzian *et al.*, 2003). Lors de la présence d'un blocage du transport linéaire des électrons, l'excitation du complexe antennaire du PSII peut transférer cette excitation directement à  $\text{O}_2$ , ce qui entraîne la formation d'oxygène singulet pouvant altérer l'appareil photosynthétique. Au contraire, les herbicides de type urée et l'atrazine, en augmentant cet écart énergétique entre  $\text{P680}^{+}\text{Q}_\text{A}^{--}$  et  $\text{P680}^{+}\text{Ph}^{\cdot-}$  rendent la recombinaison de charge de  $\text{P680}^{+}\text{Q}_\text{A}^{--}$  possible, une plus grande proportion de cette paire peut se désintégrer par une voie moins dommageable et rendre la voie de formation de  $^3\text{P680}$  impossible (Krieger-Liszkay et Rutherford, 1998). Quand un herbicide bloquant le PSII est présent, les dommages créés par la lumière devraient augmenter. La baisse du potentiel de  $\text{Q}_\text{A}$  induite par la présence des herbicides phénoliques permet le retour en arrière des électrons résultant dans des photodommages accrus (Pallett et Dodge, 1980) tandis que l'atrazine en augmentant le potentiel de  $\text{Q}_\text{A}$  (Krieger-Liszkay et Rutherford, 1998) rend cette réaction en arrière plus difficile limitant ainsi les dommages (Pallett et Dodge, 1980). En fait, les dommages induits par la lumière sont très marqués avec les herbicides phénoliques mais les herbicides de type urée et l'atrazine semblent créer moins de dommages oxydants que les précédents (Rutherford et Krieger-Liszkay, 2001).

Le métolachlore, (2-chloro-*N*-(2-éthyl-6-méthylphényl)-*N*-(2-méthoxy-1-méthyl-éthyl) acétamide), un herbicide de la famille des chloroacétanilides, s'adsorbe facilement avec la matière organique du sol et est utilisé contre les mauvaises herbes dans les cultures de maïs, de fèves, de soya et autres cultures. Il peut être utilisé en mélange afin de combattre les mauvaises herbes de type eucotylédones (Santé Canada, 1986). Cet herbicide a un effet à plus long terme lors du contrôle des mauvaises herbes étant donné son lien avec les matières organiques du sol et son spectre d'application très large. Le S-métolachlore agit principalement sur l'hypocotyle (région de la pousse entre le cotylédon et la jeune racine) des adventices en germination et plus particulièrement celui des graminées. L'herbicide est absorbé par les graminées en germination principalement par la pousse à peine sortie de la graine ou par les eucotylédones en germination



au niveau des racines et des nouvelles pousses. Le S-métolachlore empêche les graminées de lever, les plantules sont difformes, les feuilles ne peuvent se déplier ou poussent sous terre (Syngenta).

Le métolachlore affecte la synthèse des lipides et des protéines (Mann *et al.*, 1965; Zama et Hatzios, 1986 ; Weisshaar *et al.*, 1988). Mann *et al.*, (1965) démontrèrent que les herbicides acétamides substitués pourraient affecter la prise et l'incorporation de certains acides aminés. La synthèse de protéines serait inhibée car l'incorporation de la leucine dans les protéines est diminuée *in vivo* (Moreland *et al.*, 1969; Duke *et al.*, 1975; Deal *et al.*, 1980). Une augmentation de la perméabilité membranaire a aussi été démontrée (Mellis *et al.*, 1982; Matthes et Böger, 2002) ainsi qu'une inhibition de la formation de la gibbérilline (Wilkinson, 1982). Les herbicides de type chloroacétamide paraissent inhiber fortement l'élongation des acides gras microsomaux ceci amenant une forte baisse de la présence des acides gras à très longue chaîne (chaîne de 20-26 carbones) chez les plantes et les cellules algales (Böger *et al.*, 2000). Il semble que l'impact phytotoxique primaire des chloroacétamides chez l'algue verte *Scenedesmus* soit l'inhibition de la biosynthèse d'acides gras à très longue chaîne, ce qui affecterait les propriétés physiques et les fonctions de la membrane plasmique (Matthes et Böger, 2002). Des tests faits sur l'avoine ont amené à la conclusion que la division cellulaire et le grossissement des cellules étaient inhibés par les chloroacétanilides (Deal et Hess, 1980). Ce même état de fait a aussi pu être démontré chez les algues vertes *Chlamydomonas reinhardtii* et *Scenedesmus acutus* (Fedtke, 1981). Toutefois, le transport des électrons ne semble pas être directement atteint par la présence d'herbicides de type chloroacétanilides (50  $\mu$ M d'alachlore et de métazachlore) chez *Bumilleriopsis* (Weisshaar et Böger, 1987). Il semblerait que les chloroacétanilides aient besoin d'être métabolisés pour que des effets soient constatés (Weisshaar et Böger, 1987).

Les mélanges d'herbicides dans les cours d'eau peuvent provenir d'applications multiples et variées sur chacun des champs agricoles pendant la saison. Ils peuvent aussi être le résultat d'une combinaison d'herbicides provenant des lessivages de sols de plusieurs champs différents. De plus, il est de plus en plus courant d'appliquer des mélanges commerciaux d'herbicides afin d'augmenter le spectre d'action du produit phytosanitaire ou bien pour en limiter le nombre d'épandage. L'utilisation dans les mélanges commerciaux d'herbicides de pré-levée est parfois nécessaire et permet de réduire la quantité d'herbicide appliquée. L'Aatrex (atrazine) permet des temps d'application flexibles. Il peut être utilisé en pré-semis, prélevée et

post-levée tandis que le Dual II Magnum (métolachlore) permet un contrôle des mauvaises herbes sur une plus longue durée tout en ayant un plus grand champ d'application. Le Primextra II Magnum (un mélange d'atrazine et de métolachlore ainsi que d'un phytoprotecteur appelé Benoxacor) permet un contrôle résiduel des mauvaises herbes (Syngenta).

Dans le Dual II magnum ainsi que dans le Primextra II magnum, une substance appelée Benoxacor (4-(dichloroacétyl)-3,4-dihydro-3-méthyl-2H-1,4-benzoxazine) est ajoutée dans ces herbicides. Cette substance appelée *safener* (phytoprotecteur) est reconnue pour protéger certaines cultures (principalement le maïs) contre les effets des herbicides de la famille des chloroacétanilides. Un phytoprotecteur protège de manière sélective les cultures tout en étant phytotoxique pour les mauvaises herbes cibles (Davies, 2001). Les phytoprotecteurs sont utilisés pour augmenter la sélectivité d'un herbicide donné. On peut utiliser ceux-ci afin de permettre une protection accrue des cultures contre des dommages pouvant être causés par la présence résiduelle d'herbicides, ceci permettant des rotations de cultures plus flexibles. L'utilisation des herbicides dans des conditions environnementales adverses et qui pourraient être dommageables pour les cultivars peut nécessiter l'utilisation de phytoprotecteurs. De plus, les phytoprotecteurs peuvent être utilisés lorsqu'on fait face à un problème de mauvaises herbes difficiles à éradiquer (Davies, 2001). La capacité des phytoprotecteurs de prévenir les effets délétères des herbicides a amené l'idée que ceux-ci pourraient interagir avec les procédés biochimiques ou les protéines cibles qui seraient normalement affectés et inhibés par l'herbicide. L'action de ces substances serait de réduire l'accessibilité des herbicides aux sites de liaisons et ainsi empêcher l'inhibition des sites cibles (Tomlin, 1995).

Plusieurs théories quant à leur action ont été mises de l'avant. Une de celle-ci serait que cet effet protecteur pourrait provenir d'une compétition pour le site de liaison entre le phytoprotecteur et l'herbicide. Ceci pourrait être le cas lorsque les conformations des molécules constituant l'herbicide et le phytoprotecteur sont très proches (Yenne et Hatzios, 1991). Une étude portant sur les similarités structurales de plusieurs combinaisons herbicides/phytoprotecteurs conclue que les phytoprotecteurs pourraient entrer en compétition avec les molécules d'herbicides pour la liaison au site protéique cible (Bordas, *et al.*, 2000). Ils pourraient, de plus, réduire la quantité d'herbicide pouvant atteindre le site de liaison de l'herbicide dans sa forme active en réduisant la captation ou la translocation de l'herbicide (Ketchersid *et al.*, 1982; Fuerst, 1987; Fuerst *et al.*, 1991). Par contre, certaines investigations sur les effets de ces substances présentent des

résultats contradictoires. Plusieurs chercheurs ont trouvé que la captation de l'herbicide n'était pas affectée (Lamoureux et Rusness, 1992) ou était même augmentée (Zama et Hatzios, 1986; Rubin *et al.*, 1985; Milhome et Batside, 1990).

Une autre hypothèse relative à la protection induite par la présence des phytoprotecteurs est que celle-ci proviendrait d'une hausse du contenu cellulaire en glutathion (Rubin *et al.*, 1985; Adams *et al.*, 1983; Ezra et Gressel, 1982; Rennenberg *et al.*, 1982). Le glutathion réduit (GSH) est largement distribué chez les plantes (ainsi que chez les cyanobactéries) où il a la fonction de détoxiquer les xénobiotiques et est un éboueur de radicaux libres, protégeant ainsi les cellules des dommages oxydants (Davies et Caseley, 1999). Un des phytoprotecteurs connus pour promouvoir l'augmentation du contenu en GSH est le dichlormid qui ferait augmenter le niveau de GSH chez le maïs (Ekler *et al.*, 1993; Carringer *et al.*, 1978; Ezra et Gressel, 1982; Adams *et al.*, 1983; Lay et Casida, 1976) le sorgho (Gronwald *et al.*, 1987) et le tabac (Rennenberg *et al.*, 1982). Parmi les autres phytoprotecteurs présentant le même effet il y a le BAS145138 (Ekler *et al.*, 1993), le benoxacor (Ekler *et al.*, 1993) et le flurazole (Gronwald *et al.*, 1987; Breaux *et al.*, 1987). Rubin *et al.*, (1985) ont montré que les phytoprotecteurs tels que le CPMI (*N*-(4-chlorophényl) maléimide), le CPMA (acide *N*-(4-chlorophényl) maléamique), le flurazole et le R-25788 (*N,N*-diallyl-2,2-dichloro-acétamide) provoquaient une hausse de 60% à 130% du niveau de glutathion (GSH) dans les racines de sorgho de 4 à 7 jours après le traitement. Le phytoprotecteur, *N,N*-diallyl-2,2-dichloroacétamide (R-25788), accélérerait le métabolisme du sulfate et augmenterait le niveau du GSH chez plusieurs plantes (Adams *et al.*, 1983; Ezra et Gressel, 1982; Rennenberg *et al.*, 1982). Il augmenterait aussi la détoxification GSH-dépendante de l'alachlor (2-chloro-2',6'-diéthyl-*N*-(méthoxyméthyl) acétanilide) chez le maïs (Mozer *et al.*, 1983).

En effet, une autre théorie, de plus en plus acceptée, est celle qui avance que le phytoprotecteur augmenterait la détoxification de l'herbicide dans une forme moins active ou en métabolites inactifs et l'efficacité de la protection serait corrélée avec l'activité des enzymes *glutathion-S-transférases* (GST; EC 2.5.1.18). Au moins 12 phytoprotecteurs ont été reconnus pour permettre l'augmentation de l'activité de la GST chez le maïs, le riz, le sorgho ou le blé (Davies et Caseley, 1999; Farago *et al.*, 1994). Certaines études faites sur des cultivars de maïs (Miller *et al.*, 1994) ainsi que de sorgho (Hirase et Molin, 2001) ont démontré sans l'ombre d'un doute que la présence du benoxacor protège les cultures en induisant une hausse de l'activité de la *glutathion-S-transférase* (GST) qui est impliquée dans la conjugaison du glutathion (GSH) au

métolachlore (Fuerst et Gronwald, 1986; Gronwald *et al.*, 1987; Ekler *et al.*, 1993) augmentant par le fait même le taux de détoxification de l'herbicide.

Les phytoprotecteurs ont aussi été reconnus pour augmenter la conjugaison de métabolites oxydants avec les glucosides et de promouvoir l'activité de pompes membranaires des vacuoles qui sont responsables de la séquestration de conjugués-métabolites dans celles-ci (Gaillard *et al.*, 1994). Il serait fort possible que plusieurs des phénomènes pré-cités se produisent conjointement (Davies, 2001).

### 1.3. Interaction des herbicides.

Des interactions entre différents herbicides ou produits toxiques ont déjà été rapportées. Dans l'étude de Allen *et al.*, (1983), les effets de deux herbicides bloquant le passage des électrons au niveau du PSII, le diuron 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée) et l'atrazine (2-chloro-4-éthylamino-6-isopropylamino-s-triazine), sur la membrane photosynthétique d'une cyanobactérie *Aphanocapsa* 6308, furent étudiés. Du diuron et de l'atrazine marqué au  $^{14}\text{C}$  furent utilisés pour déterminer les constantes d'affinité des deux herbicides ( $8,2 \times 10^{-8}$  molaire pour l'atrazine et  $1,7 \times 10^{-7}$  molaire pour le diuron) et déterminer s'il y avait compétition pour le site de liaison sur PSII entre ces deux herbicides. Les résultats démontraient une compétition du diuron avec l'atrazine pour ce site de liaison des herbicides. Dans l'étude de Pfister *et al.*, (1979), on met en évidence le fait que des chloroplastes de *Senecio vulgaris* L (sénéçon commun, mauvaise herbe de la famille des Astéracées dont fait partie le pissenlit) sensibles montrent une liaison très forte du diuron et de l'atrazine sur un site du PSII. Dans les chloroplastes sensibles, une compétition entre l'atrazine et le diuron pour le site de liaison est notée, ce qui n'est pas le cas dans les chloroplastes résistants.

Les herbicides diclofopméthyl (méthyl-2[4-(2',4'-dichlorophénoxy) phénoxy]-propanoate) (DM), qui affecte le métabolisme des lipides, et l'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (2,4-D, un herbicide auxinique), sont connus pour avoir un effet antagoniste l'un sur l'autre (Shimabukuro *et al.*, 1986). Le 2,4-D stimulerait le transport des protons via la pompe à protons tandis que le DM en augmentant la perméabilité de la membrane aux protons diminuerait le gradient électrochimique de proton (Shimabukuro *et al.*, 1982; Wright et Shimabukuro, 1982). Dans l'étude de Geoffroy *et al.*, (2002), les résultats obtenus lors de tests de croissance de l'algue *Scenedesmus obliquus* exposée à un mélange de deux herbicides, le diuron (inhibition du



transport des électrons du PSII) et l'oxyfluorfen (affecte la biosynthèse de la chlorophylle en inhibant la *protoporphyrinogene IX oxydase*), montrent que ces deux herbicides ont une interaction antagoniste. Plusieurs auteurs ont fait état de l'interaction antagoniste du diuron, ce qu'on a l'habitude d'appeler «l'effet diuron» (Teisseire et Vernet, 2000; Nicolaus *et al.*, 1989; Allen *et al.*, 1983). L'équipe de Nicolaus *et al.*, (1989) a remarqué le même antagonisme entre le diuron et l'oxyfluorfen. En effet, la phytotoxicité causée par l'oxyfluorfen, connu pour être un fort promoteur de la peroxydation des lipides, est diminuée par la présence du diuron dans le milieu. Dans l'expérience de Teisseire et Vernet, (2000), on note que le diuron prévient chez *Lemna minor* la baisse en contenu de la chlorophylle induite par le cuivre lorsque celui-ci est combiné au métal. Dans cette dernière étude, on note une faible stimulation des enzymes *glutathion réductase*, *glutathion-S-transférase* et une faible inhibition de la *catalase*. Par contre, dans l'étude de Geoffroy *et al.*, (2002), au niveau enzymatique les effets peuvent varier selon les concentrations des deux herbicides. Dans le cas de l'activité de la *glutathion-S-transférase* (GST), pour les concentrations les plus basses d'oxyfluorfen, un effet additif est noté lorsque le diuron est ajouté. Pour les concentrations les plus élevées d'oxyfluorfen, une baisse de l'activité de la GST est notée. Dans l'étude de Carder et Hoagland (1998), on montre que les effets des herbicides atrazine et alachlore sur le biovolume de la communauté algale, lorsque combinés, apparaissent être additifs plutôt que synergistes.

Quelques études toxicologiques relatives aux mélanges de produits toxiques et faites dans les milieux aquatiques ont été accomplies (Teisseire et Vernet, 2000; Thompson, 1996; Faust *et al.*, 1993, Faust *et al.*, 1994; Altenburger *et al.*, 1990). Le concept d'additivité est généralement accepté quant aux interactions possibles entre les produits contaminants. Ce concept a été utilisé pour évaluer la toxicité de mélanges de produits et des formules ont été appliquées afin de quantifier la toxicité de ces mélanges (Calamari et Vighi, 1992).

#### 1.4. Concentration addition versus action indépendante.

Les effets toxiques des produits se retrouvant dans l'environnement ne sont pas le fait d'une substance seule mais d'un ensemble de produits (Altenburger *et al.*, 1996). Cette constatation a éveillé l'intérêt sur les effets écotoxicologiques des produits toxiques depuis quelques dizaines d'années (Altenburger *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2002; Backhaus *et al.*, 2003).

Les données toxicologiques des tests faits en laboratoire avec un seul produit toxique donnent une idée des effets potentiels sur la vie aquatique mais les organismes aquatiques sont rarement exposés à un seul produit mais à des mélanges de différents produits chimiques créés par l'homme et qui ont des effets différents pris individuellement. Ces divers produits ont des actions dissemblables et il faut être en mesure de faire des prédictions valables sur la toxicité de ces mélanges à partir des données toxicologiques de composés individuels.

Les théories qui supportent notre compréhension des effets des mélanges de toxiques sont celles de la concentration addition (Loewe et Muischnek, 1926) et celle de l'action indépendante (Bliss, 1939). La toxicité de mélanges de produits ayant des effets similaires ou différents peut être prédite par des modèles d'addition concentration et d'action indépendante en utilisant des données de toxicité pour des substances seules.

Dans le cas où les produits composant un mélange possèdent des mécanismes d'action communs, la théorie de concentration addition (CA) est généralement acceptée comme estimation raisonnable de leurs effets toxiques conjoints (Calamari et Vighi, 1992). Des tests toxicologiques faits avec des mélanges composés de multiples substances ayant des effets variés, et ce, sur divers types de vie aquatique confirment le fait que la théorie de la concentration addition est valable (De Wolf *et al.*, 1988; Xu et Nirmalakhandan, 1998; Altenburger *et al.*, 2000; Backhaus *et al.*, 2000; Faust *et al.*, 2001). Par contre, l'expression «action similaire» des composés du mélange peut être sujet à interprétation. Du point de vue purement mécanique (Pösch, 1993) ce terme devrait s'appliquer si les substances interagissent de façon compétitive et de manière réversible avec le site d'action d'une molécule. Par contre, d'un point de vue plus élargi et phénoménologique (Berembaum, 1989), ceci signifierait que les différentes substances sont à même de causer une réponse toxicologique semblable.

Le concept de l'action indépendante se base sur le fait que les composés d'un mélange possèdent des effets variés et différents les uns des autres. Les produits interagiraient avec des cibles moléculaires différentes et les effets constatés sont le résultat de chaînes de réactions distinctes dans un organisme. De façon théorique, l'action indépendante est importante mais dans le cas des mélanges composés de substances ayant des modes d'action et mécanismes différents, la capacité de prédiction de leurs actions conjointes est un peu plus controversée.

Souvent trouve-t-on des concentrations de produits toxiques dans l'écosystème plus basses que celles testées en laboratoire et qui causent des effets statistiquement significatifs. Ces concentrations retrouvées dans l'environnement se trouveraient au niveau ou au-dessous de la NOEC (No Observed Effect Concentrations). On peut se demander dans ce cas si ces basses

concentrations peuvent avoir quelque pertinence pour la prédiction de la toxicité d'un mélange. La théorie de l'addition concentration s'appuie sur le fait que chacun des produits toxiques du mélange peu importe sa concentration contribue à la toxicité globale du mélange, ainsi ne tient-on pas compte des concentrations seuils. Par contre, l'action indépendante implique que seuls les toxiques du mélange possédant des concentrations suffisantes pour produire un effet peuvent contribuer à la toxicité globale du mélange.

L'étude de Faust *et al.*, (2003) démontre que le concept d'action indépendante possède une capacité élevée de prédiction de l'action toxique conjointe de produits chimiques agissant différemment. Les résultats sont valables pour des ratios de mélanges différents et même dans des situations où toutes les concentrations des produits testés étaient plus basses que leur NOEC respectives ou dans des situations où les effets toxiques de chacun des produits pris individuellement étaient statistiquement non significatifs.

Les prédictions basées sur la théorie de la concentration addition ont surestimé les effets des mélanges toxiques (16 substances chimiques) sur *Scenedemus vacuolatus* (Faust *et al.*, 2003). Une autre étude faite avec des bactéries luminescentes (Backhaus *et al.*, 2000) exposées à des mélanges de composés possédant des effets dissemblables montre que l'action indépendante possède une robustesse de prédiction élevée tandis que les prédictions des effets faits avec la théorie de l'addition concentration étaient surestimées. Lors de tests faits avec des poissons et des daphnées exposés à des mélanges hétérogènes (toxiques ayant des actions spécifiques ainsi que des inhibiteurs non-spécifiques), la toxicité constatée de ces mélanges était plus basse que celle prédite par le concept d'addition concentration (Hermens et Leeuwangh, 1982; Hermens *et al.*, 1984, Hermens *et al.*, 1985; Hamilton et Buhl, 1990).

Faust *et al.*, 2003, ont démontré dans leur étude que la théorie de l'action indépendante peut être valable pour des mélanges composés de substances ayant des mécanismes d'action différents les uns des autres et cette théorie peut fournir des prédictions valables et précises sur des tests de toxicité lorsque faits sur une seule espèce. Il faut quand même prendre en compte que nous ne connaissons pas tous les mécanismes d'action de tous les composés toxiques qui se retrouvent dans l'environnement, ce qui peut être une limitation lorsque l'on veut utiliser cette théorie comme outil de prédiction de toxicité dans des procédures de modélisation.

Le concept de la concentration addition est plus facile à utiliser mais aurait tendance à estimer à la hausse les effets des mélanges de produits ayant des effets dissemblables. Dans une perspective de régulation, cette surestimation peut être mineure et peut être défendue car prise dans une vision de sécurité.

## CHAPITRE II

### II. EFFETS DES HERBICIDES SUR L'ENVIRONNEMENT AQUATIQUE

#### 2.1. Effets sur les organismes photosynthétiques.

Les espèces peuvent avoir des sensibilités différentes dues aux mécanismes variés de protection contre les ERO et leur capacité à métaboliser les xénobiotiques. Par exemple, l'atrazine et le métolachlore sont détoxiqués via la conjugaison au glutathion. Tang *et al.*, (1998) ont démontré que l'atrazine était détoxiqué via la *glutathion-S-transférase* chez des algues. Ils ont aussi noté que l'activité de la GST était affecté par le pH du milieu. Pour les algues vertes, le pH optimal tournait autour de 7,0-8,0 tandis que pour les diatomées, le pH optimal était légèrement plus élevé que dans le cas des algues vertes (7,0-9,5).

Pflugmacher *et al.*, (2000) ont démontré que la conjugaison de l'atrazine pouvait être détectée chez de nombreuses plantes incluant des algues marines. La conjugaison de l'atrazine a été détectée chez de nombreuses espèces telles que le maïs (Shimabukuro, 1968; Shimabukuro *et al.*, 1970; Shimabukuro *et al.*, 1971) le sorgho (Lamoureux *et al.*, 1970), chez de mauvaises herbes (Hatton *et al.*, 1996). Pour Shimabukuro *et al.*, (1970), le facteur premier de la sélectivité de l'atrazine chez le maïs est l'activité de l'enzyme soluble *glutathion-S-transférase* (GST). Ils ont démontré que des plants de maïs sensibles à l'atrazine avaient une activité de la GST plus faible que des plants plus résistants. Une quantité significative d'atrazine inchangé, non métabolisé, s'est accumulée dans les plants de la lignée sensible. La détoxification rapide de l'atrazine par conjugaison au glutathion chez le maïs résistant a eu comme résultat une récupération de la photosynthèse qui avait auparavant été affectée par la présence de l'herbicide.

De plus, des mécanismes impliqués dans la protection des espèces photosynthétiques contre la photo-inhibition et la destruction du photosystème II existent (Müller *et al.*, 2001). L'énergie excédentaire peut être retournée sous forme de chaleur permettant ainsi une diminution de la formation de chlorophylles excitées à l'état singulet. De plus, les antennes collectrices des photosystèmes II peuvent se déplacer dans la membrane et se joindre à celles du photosystème I afin de redistribuer l'énergie entre les deux photosystèmes, ceci protégeant le photosystème II

contre un excédent d'énergie susceptible de le détruire. Ces différentes voies seront détaillées à la section 4.6.

La qualité de la croissance peut indiquer l'existence d'un effet délétère causé par un xénobiotique (Stratton *et al.*, 1979) et ce paramètre peut être un moyen de déterminer les effets des herbicides sur les organismes aquatiques. Thompson *et al.*, (1993) ont rapporté que l'exposition chronique du phytoplancton à du hexazinone (un triazine) diminuait la biomasse de celui-ci de manière concentration-dépendante dans des mésocosmes. Lockert *et al.*, (2006) ont démontré qu'il n'y avait pas de différences notables sur la croissance pour toutes les espèces testées : *Ankistrodesmus falcatus*, *Chlorella vulgaris*, *Staurastrum cristatum* (algues vertes); *Cyclotella meneghiniana*, *Nitzschia palea* (diatomées); *Cryptomonas ovata* (Cryptomonades); *Arthrospira*, *Synechococcus* (Cyanobactéries); *Euglena gracilis* (Euglénoides) jusqu'à concurrence de 10 µg/L (0,046µM) d'atrazine. Par contre, les différentes espèces et taxons étudiés présentèrent des différences de sensibilités lorsque exposés à 100 µg/L (0,46µM) d'atrazine. À cette concentration, la croissance des algues vertes était très fortement inhibée tandis que celle des cyanobactéries l'était modérément. Les diatomées, cryptomonades et euglénoides ne montrèrent aucune inhibition notable de la croissance. Fairchild *et al.*, (1997) ont testé les effets de 16 herbicides (atrazine, métribuzin, simazine, cyanazine, alachlore, métolachlore, chlorsulfuron, metsulfuron, triallate, EPTC, trifluralin, diquat, paraquat, dicamba, bromoxynil et 2,4-D) sur *Lemna minor* (famille Lemnaceae), une plante vasculaire aquatique, et l'algue unicellulaire verte *Selenastrum capricornutum* (famille des Chlorophyceae) et ont mis en évidence la différence de sensibilité inter-espèce. Par la suite, Fairchild *et al.*, (1998) rapportent que les algues vertes (*Selenastrum*, *Chlorella*, *Chlamydomonas* et *Scenedesmus*) sont plus sensibles à l'atrazine, au métribuzin, à l'alachlore ou au métolachlore que les cyanobactéries (*Microcystis* et *Anabaena*), *Anabaena* étant l'espèce la moins sensible de toutes. *M. aeruginosa* montra une certaine sensibilité à l'atrazine

Plusieurs études sur les effets des triazines sur le biote aquatique ont été faites (De Noyelles *et al.*, 1982; Huber, 1993; Gustavson et Wangberg, 1995; Behra *et al.*, 1999; Lockert *et al.*, 2006). Les concentrations d'atrazine ayant pu causer une inhibition de la croissance varient entre 1,0 µg/L (4,5 nM) (DeNoyelles *et al.*, 1982 ; Stratton, 1984) à plus de 3 mg/L (14µM) (Fairchild *et al.*, 1998). Herman *et al.*, (1986), déterminèrent que les cyanophytes étaient éliminées par l'atrazine tandis que la plupart des espèces de bacillariophytes et de chlorophytes ne l'étaient pas. Il y a eu plusieurs études démontrant que les chlorophytes seraient plus sensibles aux



inhibiteurs de transport électronique au niveau du PSII tels que l'atrazine (DeNoyelles *et al.*, 1982; Hamala et Kollig 1985; Hoagland *et al.*, 1993; Kasai *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 1998) tandis que les diatomées seraient plus résistantes (DeNoyelles *et al.*, 1982; Hoagland *et al.*, 1993; Kasai *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 1998). Tang *et al.*, (1998) ont mis en évidence que les algues vertes sont très sensibles à l'atrazine tandis que les cyanobactéries y sont moins sensibles. Tang *et al.*, (1997), rapportent qu'à basses concentrations (10 et 20 µg/L ou 0,046 et 0,092 µM), l'atrazine stimule la croissance et le contenu en chlorophylle *a* d'une algue verte (*Chlamydomonas*) et d'une diatomée (*Synedra acus*). La stimulation de croissance observée lors d'expositions à de faibles concentrations de toxiques pourrait être le résultat d'une adaptation des pigments photosynthétiques (Hatfield *et al.* 1989, Gustavson et Wangberg, 1995). Rioboo *et al.*, (2002) constatent que l'exposition des algues à de faibles concentrations d'herbicides de type triazine (0,025 µM terbutryn), provoque une augmentation de la densité cellulaire et du taux de croissance après 96 heures. Cette stimulation de la croissance, obtenue aux concentrations les plus basses de terbutryn, montre la capacité des cellules algales, telles que *Chlorella vulgaris*, à s'adapter et à résister aux effets inhibiteurs des herbicides. Par contre, ces effets disparaissent à concentrations plus élevées. Gonzalez-Barreiro *et al.*, (2004) rapportèrent aussi une stimulation du contenu en chlorophylle *a* et en caroténoïdes par l'atrazine à 48 heures suivie d'une baisse du contenu pigmentaire à 96 heures chez la cyanobactérie *Synechococcus elongatus*. Ces effets stimulants ont déjà été notés avec d'autres espèces et différents herbicides (El-Dib *et al.*, 1991; Franqueira *et al.*, 1999). Une réponse comme la synthèse de composants des thylacoïdes est considérée comme une adaptation générale aux situations dans lesquelles le transport photosynthétique des électrons est fortement limité (Behra *et al.*, 1999). La résistance pourrait être due à une structure spécifique du PSII et à la composition pigmentaire (Hatfield *et al.*, 1989). L'atrazine induirait des effets qui seraient comparables à ceux générés par des conditions limitées de lumière, c'est-à-dire que les cellules algales auraient un contenu en chlorophylle plus élevé. Hatfield *et al.*, (1989), démontrèrent que le DCMU et le terbutryn (un triazine) induisaient chez *Anacystis nidulans* une réponse qui était caractéristique des organismes photosynthétiques ayant crû sous des conditions de basse luminosité. Le contenu en un pigment accessoire appelé phycocyanine augmentait en relation avec celui de la chlorophylle, le profil pigmentaire changeant avec chaque dose d'herbicide. De plus, le ratio phycocyanine/chlorophylle augmentait avec l'augmentation des concentrations d'herbicides. De plus, lors de l'étude de Rioboo *et al.*, (2002), on note un accroissement de la taille des cellules. L'étude de Tang *et al.*, (1998), montrait une corrélation entre le volume des cellules et la toxicité.

Selon Guasch et Sabater (1998), les inhibiteurs de PSII seraient moins toxiques pour des algues adaptées à des conditions de faibles luminosités, ce qui est le cas des diatomées.

Dans l'étude de Fairchild *et al.*, (1998), le métolachlore se montrait le moins toxique de tous les herbicides testés (atrazine, métribuzin, alachlore et métolachlore). Le métolachlore semble être nettement moins toxique que l'atrazine pour les cyanobactéries (Fairchild *et al.*, 1998; Day et Hodges, 1996). Dans l'étude de Weisshaar et Böger, (1987), qui utilisent l'algue verte *Scenedesmus acutus* comme matériel d'étude, on remarque que la présence de chloroacétanilides (métolachlore) n'inhibe pas le transport des électrons. Par contre, le contenu en chlorophylle a baissé de 20-35 % après une période de 24 à 48 heures. Le contenu en caroténoïdes fut encore plus diminué, de 50% et plus dans certains cas. Il semblerait, d'après les auteurs, que cette baisse dans la quantité de la chlorophylle ne soit pas due à une dégradation des pigments ni à l'accumulation de précurseurs des caroténoïdes (phytoène) mais plutôt à une atteinte d'une voie de la biosynthèse commune aux deux pigments. De plus, lors de cette étude, on constate une atteinte à la synthèse des lipides chez *Scenedesmus acutus*. L'équipe de Singh *et al.*, (1979) a étudié les effets de l'alachlore sur des souches de l'algue bleu-vert *Nostoc muscorum* et a trouvé que l'alachlore a un fort effet inhibant sur la croissance et est mutagène.

Dans l'étude de Fairchild *et al.*, (1998), on remarque que les variations de sensibilités inter-espèces sont moins marquées pour les triazines que dans le cas des chloroacétanilides. Ces différences entre les herbicides de classes chimiques différentes (triazines versus chloroacétanilides) sont probablement dues, d'après les auteurs de cette étude, aux modes d'action de chacune des classes d'herbicides. Les triazines ayant un mode d'action unique, ils inhibent le transport des électrons, tandis que les chloroacétanilides ont des modes d'action variés puisqu'ils inhibent de nombreuses réactions biosynthétiques.

Les herbicides peuvent affecter la composition d'une communauté algale lorsqu'ils sont ajoutés au milieu. En fait, voir l'étude de Lurling et Roessink, (2006) qui trouvèrent que *Scenedesmus* avait une croissance plus rapide et était plus compétitive que *Microcystis aeruginosa* dans un milieu sain mais cette tendance était renversée lorsque l'on ajoute du métribuzin (triazinone) dans le milieu. Même si la croissance de *Microcystis* était affectée à la baisse, la cyanobactérie se retrouvait finalement dominante dans le milieu. Donc, cet apport d'herbicide peut favoriser la dominance de la cyanobactérie. L'étude de Spawn *et al.*, (1997) montra que l'alachlore, un herbicide ayant un mode d'action similaire à celui du métolachlore, altérait la biomasse et la

composition de la communauté algale se trouvant dans des cours d'eau en région agricole. Les algues bleu-vert (cyanobactéries) et les diatomées centriques étaient plus résistantes que les algues vertes à des expositions de 30 µg/L (0,11 µM) et 100 µg/L (0,37 µM) d'alachlore. Dans l'expérimentation de DeNoyelles *et al.*, 1982, des étangs ont reçu une seule addition d'atrazine en concentration de 20 µg/L (0,09 µM) et 500 µg/L (2,3 µM) et ont été comparés avec des étangs témoins pour une durée de 136 jours. Les deux concentrations ont affecté à la baisse la croissance du phytoplancton au bout de quelques jours. Puis, des changements de structure sont apparus et les espèces phytoplanctoniques les plus résistantes à l'atrazine se sont établies.

## 2.2. Effets sur les cyanobactéries.

La plupart des cyanobactéries photosynthétiques, ou algues bleu-vert, sont sensibles aux inhibiteurs du PSII. Plusieurs études sur les effets des herbicides sur le transport des électrons montrent que l'herbicide diuron agit sur le côté oxydant du PSII, plutôt que sur le côté réducteur comme dans les plantes supérieures (Schmid et Lehmann-Kirk, 1977 ; Codd et Cossar, 1978). Par contre, une autre étude sur l'inhibition par le diuron du transport photosynthétique des électrons chez la cyanobactérie photohétérotrophe *Aphanocapsa 6714* démontre que le diuron agit de la même façon dans le transport des électrons chez les cyanobactéries que pour les plantes supérieures (Astier *et al.*, 1979). Des profils de fluorescence, cinétiques représentant l'activité photosynthétique et les diverses modifications du transport électronique dans l'appareil photosynthétique, ont été faits avec les souches sauvages de la cyanobactérie *Aphanocapsa 6714* (ATCC 27178) et le mutant résistant au DCMU (DCMU<sup>r</sup>-II). Une modification du profil de fluorescence de l'organisme photosynthétique est notée lorsqu'il est exposé à des inhibiteurs de transport d'électrons tels que le DCMU ou l'atrazine. Pour ce qui est des effets des chloroacétanilides sur les cyanobactéries, les effets semblent peu marqués. Dans l'étude de Juneau *et al.*, (2001), on voit que *Mycrocystis aeruginosa* est peu sensible au métolachlore. Dans l'étude de Fairchild *et al.*, 1998, on note une forte résistance de *M. aeruginosa* aux chloroacétanilides, alachlore et métolachlore.



### 2.3. Production des espèces réactives oxygénées.

La vie aérobique peut apporter son lot de problèmes, c'est-à-dire qu'il peut y avoir formation de l'oxygène singulet et des trois états rédox intermédiaires (superoxyde, peroxyde et radical hydroxyle) entre  $O_2$  et sa forme complètement réduite  $H_2O$ , états tous très réactifs. Les réactions de transfert d'électrons en présence d'oxygène peuvent produire une certaine quantité de ces trois intermédiaires rédox. La chlorophylle est le pigment qui permet de capter l'énergie lumineuse afin de la transformer en énergie chimique mais si cette énergie n'est pas utilisée d'une façon productive ceci peut entraîner des dommages. Les électrons qui se trouvent à l'état excité singulet peuvent se rephaser (changer l'orientation de leur spin) et amener un état d'excitation plus bas qui entraîne la formation de l'état triplet de la chlorophylle. Cet état triplet peut alors réagir avec  $^3O_2$  et permettre la formation de la molécule très réactive de  $^1O_2$ . Ces réactions sont à l'origine du stress oxydant causée par la chlorophylle chez les plantes (Rutherford et Krieger-Liszkay, 2001). La molécule de peroxyde d'hydrogène est relativement stable et peut traverser les membranes librement. Ce qui implique que  $H_2O_2$  peut diffuser dans la cellule et causer des dommages, mais aussi, signaler un stress et recruter des défenses (Bechtold *et al.*, 2005). Par contre,  $^1O_2$  et les radicaux hydroxyles sont plus réactifs que le peroxyde d'hydrogène.  $H_2O_2$  peut amener la formation, via la réaction de Haber-Weiss catalysée par le fer (Imlay et Linn, 1988), de radicaux hydroxyles ( $OH^\bullet$ ), une des formes les plus réactives des espèces réactives oxygénées. En fait, les propriétés destructrices de  $H_2O_2$  et du superoxyde proviennent principalement de leur rôle dans la formation du radical  $OH^\bullet$ , plutôt que de dommages directs (Imlay et Linn, 1988). Le superoxyde est une molécule chargée qui passe difficilement au travers des membranes, donc la compartimentation et des mécanismes de défense sont importants. Les hydroperoxydes lipidiques sont plus à même de causer des dommages aux membranes que les superoxydes (Ledford et Niyogi, 2005).

$^1O_2$  est généralement généré dans le PSII, et ce, même en absence de stress environnementaux évidents (Keren *et al.*, 1995). L'oxydation de l'eau, d'où proviendront les électrons qui serviront à la photochimie, permet la création de  $O_2$ , et ce, de manière naturelle. Les conditions environnementales variant très rapidement, un dérèglement de l'équilibre entre l'énergie captée et utilisée est fréquent, ce qui peut entraîner une élévation de la production d'espèces réactives oxygénées. Le temps de vie de  $^1O_2$  est court et cette molécule est trop réactive pour se déplacer très loin de son lieu de production avant de réagir avec une molécule biologique (Moan, 1990). C'est pourquoi  $^1O_2$  généré dans le chloroplaste est plus à même d'affecter directement les

lipides et les protéines membranaires situées près du site de génération de  $^1\text{O}_2$ . Ce qui fait du centre réactionnel de PSII la cible toute trouvée de l'action de  $^1\text{O}_2$ . Il y a des évidences que  $^1\text{O}_2$  contribue aux photo-dommages du centre réactionnel du PSII, ce qui entraîne la photo-inhibition (Mishra et Ghanotakis, 1994). Un stress sévère causé par  $^1\text{O}_2$  peut, de plus, inhiber la réparation de la protéine D1 du PSII (Nishiyama, 2004). Ceci forme un cycle vicieux (moins de PSII en état d'utiliser la lumière) et permet la génération d'encore plus de  $^1\text{O}_2$  dans l'antenne (Hideg *et al.*, 1998).  $^1\text{O}_2$  peut se lier directement aux doubles liens d'acides gras polyinsaturés pour former des peroxydes lipidiques (LOOH) (Girotti et Kriska, 2004). Les autres espèces oxygénées radicalaires, incluant LOOH, peuvent initier la peroxydation des lipides. La présence de nombreuses molécules d'acides gras poly-insaturés dans les membranes des chloroplastes favorise l'initiation de réactions en chaîne de peroxydation des lipides qui émanent du site d'initiation et se propagent jusqu'à ce que les antioxydants arrêtent la chaîne ou que le substrat vienne à manquer (Girotti et Kriska, 2004). Le PSII, par son implication directe avec la molécule  $^1\text{O}_2$ , est un objet d'étude important. Comme il a été dit précédemment, le stress causé par  $^1\text{O}_2$  se fait surtout sentir au niveau du PSII mais le PSI aussi peut être affecté. Un haut potentiel de réduction sur le côté accepteur du PSI pourrait réduire l'oxygène en superoxyde, particulièrement lorsque la disponibilité du  $\text{CO}_2$  est limitée. Mais le superoxyde est converti rapidement en peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) soit spontanément soit grâce à des *superoxydes dismutases* (SOD) (Asada, 2000).

## CHAPITRE III

### III. LA PHOTOSYNTHESE

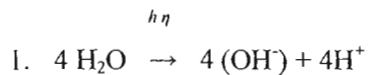
#### 3.1. Aperçu général.

La photosynthèse est le processus principal qui exploite l'énergie solaire pour la production primaire qui est à la base de la chaîne alimentaire. Les plantes, algues et quelques autres organismes tels que des bactéries photosynthétiques produisent ainsi les matériaux alimentaires essentiels (Hall et Rao, 1994). La photosynthèse est un processus utilisant l'énergie radiante électromagnétique (énergie solaire) et qui la transforme grâce à un système photochimique localisé dans la membrane des thylacoïdes en potentiel réducteur (NADPH) et en unité phosphorylée avec un haut pouvoir énergétique (ATP) (phase claire). Ces deux composés sont utilisés par la suite pour favoriser un processus endergonique se passant dans le cycle de Calvin (phase obscure) et menant à la formation d'hexoses par une série de réactions enzymatiques localisées dans le stroma (Garrett et Grisham, 2000).

On représente généralement ce processus sous une formule qui illustre la voie principale de la conversion du  $\text{CO}_2$  et de l'eau en hydrates de carbone et en molécule d'oxygène :



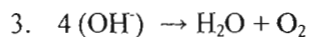
Cette formule peut être représentée en trois étapes (Hall et Rao, 1994) telles que:



où  $\text{OH}^\cdot$  est le premier oxydant et  $\text{H}^+$  est le réducteur primaire.



où le réducteur primaire réduit le dioxyde de carbone en matériel cellulaire.



où le premier oxydant peut être éliminé sous forme de  $\text{O}_2$  et formation d'eau.

Grâce à l'apport énergétique, le  $\text{CO}_2$  et l'eau (matériaux de départ) sont convertis en composés plus riches en énergie, notamment les hydrates de carbone (produits finaux).

### 3.2. Phase claire de la photosynthèse.

La phase claire est la partie de la photosynthèse se déroulant dans la membrane des thylacoïdes et utilisant les complexes protéiques intrinsèques appelés photosystème I (PSI) et photosystème II (PSII) liés par une chaîne de transport des électrons.

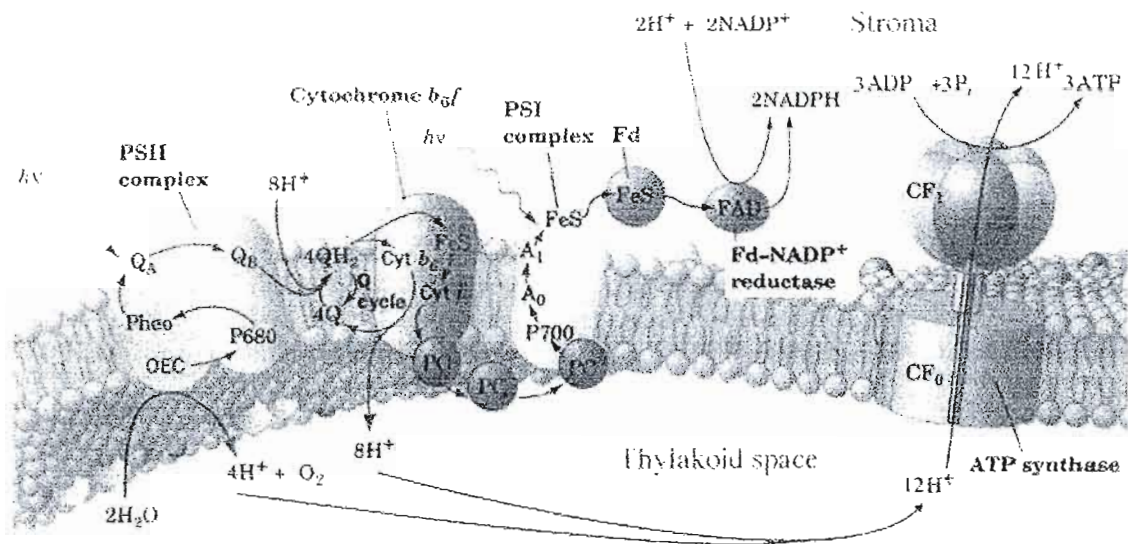


Figure 3.1. Schéma illustrant les composants de l'appareil photosynthétique.

<http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462b/Miesfeld/Photosynthesis.html>

La photosynthèse débute lorsque l'énergie lumineuse atteint les antennes collectrices de lumière (ACL) qui transmettent cette énergie au centre réactionnel du PSII composé de deux molécules de pigments de chlorophylle *a*, molécule composée d'un cycle porphyrine hydrophile à 4 noyaux tétrapyrroliques ayant en son centre un atome de magnésium lié par coordination et d'une queue hydrophobe phytyle (un alcool à longue chaîne ( $\text{C}_{20}$ ) estérifiée à un substituant du cycle pyrrole IV) qui permet l'ancrage de la chlorophylle dans les complexes protéiques membranaires (Garrett et Grisham, 2000). Notons qu'une unité photosynthétique contient de

nombreuses molécules de pigments (chlorophylle *a* et *b*, caroténoïdes, phycobilines) mais n'a qu'un seul centre réactionnel. La longueur d'onde d'excitation du centre réactionnel de PSII (P680) est de 680 nm tandis que celle du PSI (P700) est de 700 nm.

L'énergie d'un quantum excite P680 en P680\* qui devient alors capable de réduire une molécule de phéophytine (une molécule de chlorophylle semblable à la chlorophylle *a* mais n'ayant pas d'atome de magnésium au centre du cycle porphyrine mais deux ions H<sup>+</sup>). La perte de l'électron au profit de la phéophytine (Pheo) transforme P680\* en P680+. Le P680+ voit son électron éjecté remplacé par un électron en provenance d'une tyrosine (Yz). La tyrosine oxydée (Yz +) voit son électron remplacé par un autre en provenance de molécules d'eau hydrolysées par le complexe de dégagement d'oxygène (CDO) constitué de quatre atomes de manganèse. L'électron passe ensuite par une série d'accepteurs dans le PSII tels que deux quinones (Q<sub>A</sub> et Q<sub>B</sub>) présentes sur des protéines D2 et D1 respectivement (Garrett et Grisham, 2000). Sur le côté «accepteur» du PSII (Q<sub>B</sub>), La plastoquinone est réduite par des électrons en deux photo-réactions consécutives tandis que sur le côté «donneur» (Q<sub>A</sub>), quatre réactions photochimiques consécutives accumulent le pouvoir oxydant nécessaire pour arracher quatre électrons de deux molécules d'eau, ceci résultant en la libération d'une molécule de O<sub>2</sub> et de 4 protons (Rutherford et Krieger-Liszkay, 2001).



Or, la capture d'un photon libère un électron de la chlorophylle et fait apparaître une seule charge positive à la fois; donc un accepteur S (qui a récupéré les électrons de l'eau et les cède aux chlorophylles) doit donc accumuler successivement 4 charges positives correspondant à l'absorption successive de 4 photons (chaque électron cédé par le corps S sert à régénérer une molécule de chlorophylle).

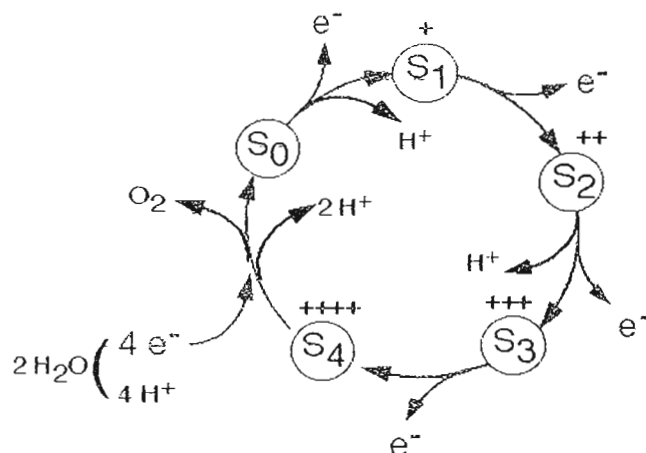


Figure 3.2. Cycle de l'oxydation de l'eau dans le complexe de dégagement d'oxygène. Il est proposé que le système d'oxydation de l'eau passe par 5 étapes successives de  $S_0$  à  $S_4$ . Le transfert des électrons de l'eau ( $2 \text{ H}_2\text{O}$ ) s'effectue en une étape; le complexe emmagasine donc 4  $e^-$  (état  $S_0$ ). Le complexe cède ensuite ces électrons successivement 1 à 1 en 4 étapes ( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  et  $S_4$ ) à quatre molécules de  $\text{P}_{680}^+$  apparues consécutivement à l'absorption de 4 photons, ce qui régénère les 4 molécules  $\text{P}_{680}$  qui sont susceptibles d'être à nouveau excitées.

Source : <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthese-cours/index.htm>

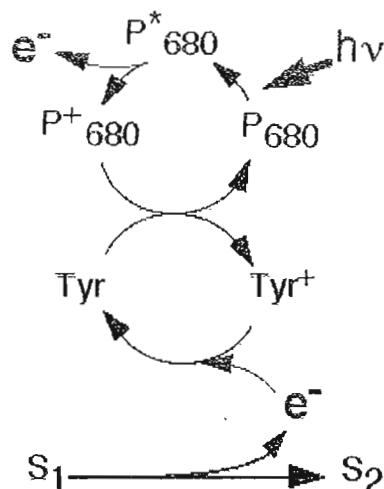


Figure 3.3. Régénération du  $\text{P}_{680}$ . Chaque électron émis au cours de ce cycle lors de la transition entre deux états S (ici  $S_1/S_2$ ) permet la régénération d'une molécule de chlorophylle.

Source : <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthese-cours/index.htm>

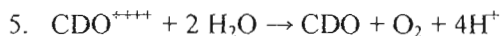
L'électron en provenance de la phéophytine passe à  $Q_A$  puis à la deuxième quinone  $Q_B$ . L'électron provenant de  $Q_B$  est transféré à un pool de plastoquinone. La plastoquinone est une molécule hydrophobe qui peut se déplacer dans la membrane et servir de navette entre le PSII et le complexe cytochrome  $b_6/f$ . Le retour de la plastoquinone à sa forme hydroquinone nécessite un proton. Les protons sont pompés du stroma, par l'intermédiaire d'un cycle plastoquinone, et insérés dans la lumière du thylacoïde, créant ainsi un gradient de proton qui sera utilisé ultérieurement par l'*ATP synthase* pour la formation d'ATP (Mitchell, 1961; Jagendorf, 1962; Jagendorf et Uribe, 1966). Le cytochrome  $b_6/f$ , ou *plastoquinol: plastocyanine oxydo-réductase* est une grosse structure protéique (210 kDa) formé de deux protéines (cyt  $b_6$  et cyt  $f$ ) dont les hèmes et les centres fer-soufre participent au transfert des électrons vers le PSI. La plastocyanine est une petite molécule qui diffuse très rapidement dans la membrane du thylacoïde et lui permet de jouer le rôle de navette électronique entre le cytochrome  $b_6/f$  et PSI. Au même moment, P700 du PSI est excité ( $P700^*$ ) par la lumière puis oxydé ( $P700^+$ ) par le transfert d'un de ses électrons à une molécule de chlorophylle  $a$  particulière ( $A_0$ ) qui transmet par la suite cet électron à une quinone ( $A_1$ ) qui cède ensuite cet électron à la première ferrédoxine d'une série de ferrédoxines liées à la membrane. La dernière ferrédoxine est soluble ( $Fd_s$ ) et donne son électron à la ferrédoxine *NADP<sup>+</sup> oxydo-réductase*, une flavoprotéine qui catalyse la réduction du  $NADP^+$ . Le NADPH ainsi formé sera utilisé tout comme l'ATP dans le cycle obscur de la photosynthèse, le cycle de Calvin. L'électron qui a été retiré du P700 est remplacé par celui en provenance de la plastocyanine (Garrett et Grisham, 2000). On pourrait représenter le voyage électronique dans le PSII comme suit :

h  $\eta$

$P680 \rightarrow P680^*$  (état excité singulet de la chlorophylle)

1.  $P680^* + \text{Pheo} \rightarrow (\text{Pheo}^{\cdot-}) + (P680^{++})$   
(Hall et Rao, 1994)
2.  $(\text{Pheo}^{\cdot-}) + Q_A \rightarrow (P680^{++}) + (Q_A^{\cdot-})$   
(Hall et Rao, 1994; Rutherford et Krieger-Liszkay, 2001)
3.  $(P680^{++}) + \text{Tyrosine Z} \rightarrow (P680^+) + (\text{Tyrosine Z}^{\cdot-} (\text{H}^+) Q_A^{\cdot-})$   
(Rutherford et Krieger-Liszkay, 2001)
4.  $(\text{Tyrosine Z}^{\cdot-} (\text{H}^+) Q_A^{\cdot-}) + \text{CDO} \rightarrow \text{Tyrosine Z} + \text{CDO}$   
(Rutherford et Krieger-Liszkay, 2001)





(Hall et Rao, 1994)

### 3.3. Phase obscure de la photosynthèse.

Le cycle de Calvin attache chaque mole de dioxyde de carbone à une mole d'un glucide à cinq atomes de carbone appelé ribulose biphosphate (RuBP en abrégé). L'enzyme qui catalyse cette première étape est la *RuBP carboxylase*, la protéine la plus abondante dans les chloroplastes et probablement sur terre. La réaction donne un intermédiaire à six atomes de carbone, si instable qu'il se scinde aussitôt en deux moles de 3-phosphoglycérate. À l'étape suivante, chaque molécule de 3-phosphoglycérate reçoit un groupement phosphate supplémentaire pris à l'ATP par une enzyme, la *phosphoglycérate kinase*, ce qui forme du 1,3-biphosphoglycérate. Puis suit une réduction, grâce au NADPH, du 1,3-biphosphoglycérate en glycéraldéhyde-3-phosphate (PGAL) grâce à l'enzyme *glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase*. Plus précisément, les électrons du  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  réduisent le groupement carboxyle du 1,3-biphosphoglycérate, qui devient alors le groupement aldéhyde du PGAL; ce PGAL est un glucide à trois carbones, le même que celui que la glycolyse forme en scindant le glucose (Garrett et Grisham, 2000).

La régénération du RuBP se réalise grâce à un ensemble de réactions faisant intervenir des sucres à nombres variés de carbones : en C6 (fructose), C4 (érythrose) et C7 (sédoheptulose). Finalement, les pentoses phosphate formés (RuP) doivent être convertis en RuBP grâce à l'ATP. Cette réaction de phosphorylation est catalysée par la *Phosphate Ribulose Kinase* (PRK). À partir de 5 trioses phosphate (C3P) il se forme donc 3 pentoses phosphate : entre les deux étapes, on trouve les intermédiaires en C6, C4 et C7. Pour synthétiser une mole nette de PGAL, le cycle de Calvin consomme neuf moles d'ATP et six moles de  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ . Les réactions photochimiques régénèrent l'ATP et le  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ . Le PGAL issu du cycle de Calvin devient la matière première de voies métaboliques qui synthétisent d'autres composés organiques, dont une variété de glucides.



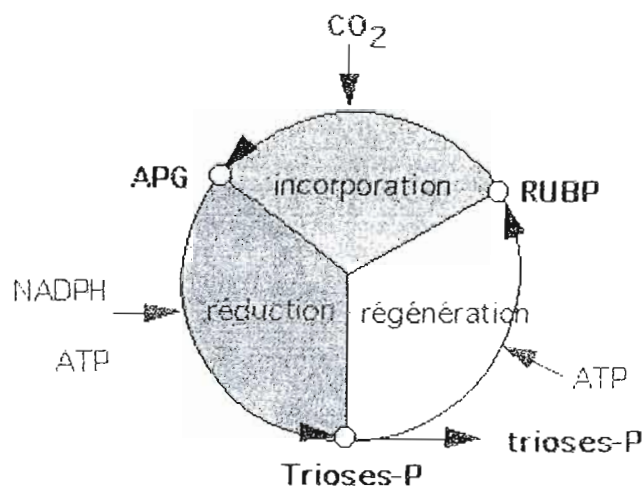


Figure 3.4. Cycle simplifié de Calvin Benson. Pour fonctionner, il nécessite des intermédiaires énergétiques (ATP et NADPH) produits par la phase photochimique. Le cycle comporte trois étapes essentielles : l'incorporation proprement dite du  $\text{CO}_2$ , la réduction du 1,3-phosphoglycérate en trioses, puis la régénération du RUBP à partir d'une fraction des trioses formés.

Source : <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthese-cours/index.htm>

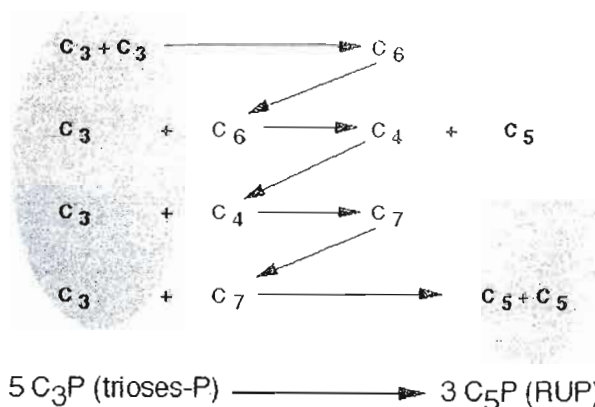


Figure 3.5. Régénération du Ribulose 1-5 bis phosphate à partir des trioses phosphate. Seuls les nombres de carbones des molécules sont pris en compte pour représenter le processus de régénération.

Source : <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthese-cours/index.htm>

### 3.4. Les antennes collectrices de lumière des cyanobactéries se distinguent.

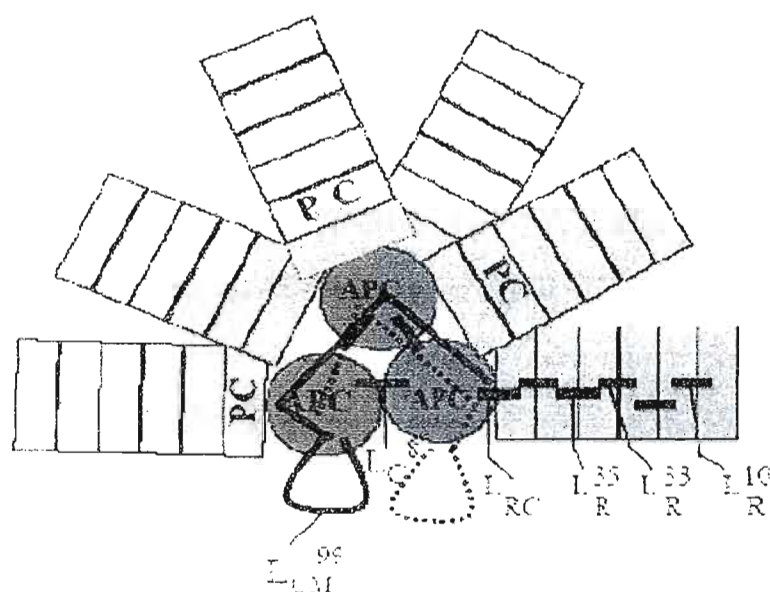
Certains groupes d'organismes photosynthétiques ne possèdent pas d'antennes collectrices insérées dans la membrane photosynthétique et composées de chlorophylle-*a/b* comme chez les plantes vertes (Campbell, 1998). Chez les cyanobactéries, les principaux complexes de captation de l'énergie lumineuse sont des macrostructures de tailles considérables (700 à 15 000 kDa) appelés phycobilisomes (Figure 3.6., Figure 3.7. et Figure 3.8.) et qui sont périphériques à la membrane thylacoïdale plutôt qu'intégrés dans la membrane (Gantt, 1975 ; Gantt, 1981 ; Zuber, 1986). Ces complexes protéiques sont composés d'un cœur sur lequel sont fixés des projections radiales (bras) (Figure 3.7.).

Les phycobilisomes sont composés de complexes pigment-protéine appelés phycobiliprotéines dont l'existence est maintenant connue depuis très longtemps. En 1977, Tandeau de Marsac et Cohen-Bazire démontrèrent que les phycobilisomes sont composés de 85 % de phycobiliprotéines et de 15 % de protéines non pigmentées qui sont des polypeptides de liaison insérés au cœur des hexamères de phycobiliprotéines et qui stabilisent la structure des phycobilisomes. Le plus grand (95-120kDa) de ces peptides est le peptide de liaison cœur-membrane (Figure 3.7.) impliqué dans la fixation du phycobilisome à la membrane photosynthétique. Il lie une molécule de phycocyanobiline.

La pigmentation des cyanobactéries est un mélange composite de chlorophylle *a* et de  $\beta$ -carotène et des phycobiliprotéines prédominantes (Glazer, 1989). La chlorophylle qu'on peut retrouver chez les cyanobactéries est la chlorophylle *a* dont les centres réactionnels du PSII sont pourvus. Le PSI comporte plus de chlorophylle que le PSII. Les apophycobiliprotéines sont composées de deux sortes de peptides principaux, une chaîne alpha de 15-20 kDa et une chaîne bêta de 17-22 kDa (Grossman *et al.*, 1993). Chaque chaîne peut porter une ou plusieurs bilines attachées de façon covalente (Glazer, 1989). Des études sur les états d'agrégation des phycobiliprotéines (Berns et Scott, 1966; MacColl *et al.*, 1971) suggèrent que les phycobilisomes sont composés d'assemblages de phycobiliprotéines trimériques ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> et hexamériques ( $\alpha\beta$ )<sub>6</sub>. Les hexamères de phycobiliprotéines sont empilés et forment les cylindres des «bras» périphériques ou des sous-structures du cœur. Les trimères ont 110 Å de largeur et 30 Å d'épaisseur avec un canal central de 35 Å de diamètre. Les hexamères sont composés de deux trimères associés face à face (un hexamère est 100 Å par 60 Å).



d'absorber presque toutes les longueurs d'onde de la lumière visible, (450-660 nm) (Grossman *et al.*, 1993). La phycourobiline absorbe dans le bleu-vert, la phycoérythrine dans le vert, la phycobiliviolone dans l'orange et la phycocyanobiline dans le rouge. Les phycobiliprotéines possèdent toutes une absorbance dans les UV. Des cyanobactéries peuvent avoir des phycobilisomes contenant 700 chromophores (Gantt, 1996). Comme on le voit, les organismes contenant des phycobiliprotéines montrent un très large spectre d'absorption de l'énergie lumineuse et ont, de plus, une grande adaptabilité à la lumière incidente.



(Hankamer *et al.*, 2001)

Figure 3.7. La structure schématique du phycobilisome de *Synechocystis* sp. PC= phycocyanine; APC= allophycocyanine;  $L_{CM}$ = «linker» membranaire du cœur (core-membrane linker),  $L_C$ = «linker» interne du complexe (core linker);  $L_{RC}$ = «linker» interne des bâtonnets de pigments (rod core linker);  $L_R$ = «linker» intra-bâtonnets (rod linker).

L'ordre d'agencement des phycobiliprotéines (de l'extrémité des bras vers le cœur du complexe) est : la phycorérythrine ( $A_{max} \approx 495/545-560$  nm et fluorescence maximale 565-580 nm) ; la phycocyanine ( $A_{max} \approx 620$ nm et fluorescence maximale 650 nm) ; l'allophycocyanine ( $A_{max} \approx 650$ nm et fluorescence maximale 665 nm). Cet agencement correspond en fait à un ordre croissant d'énergie de transition.



Figure 3.8. Exemple de phycobilisomes. Photomicrographie électronique de phycobilisomes de *Synechococcus lividus*. PBS correspond aux phycobilisomes. La ligne au-dessus correspond à 0.5  $\mu\text{m}$ .

(Miller et Holt, 1977)

Plusieurs paramètres environnementaux altèrent la composition ou l'abondance des phycobilisomes. En général, la lumière de basse intensité peut stimuler la synthèse des phycobilisomes et les bras peuvent s'allonger (Öquist, 1974 a et b; Lönneborg *et al.*, 1985). Une hausse du contenu en phycobilisome est aussi constatée chez des cyanobactéries ayant crû avec une prépondérance de lumière de type PSI (lumière rouge lointain et longueur d'onde de 700 nm). Une augmentation dans le nombre et la taille des phycobilisomes produits dans ces conditions peut aider à équilibrer le flux d'électrons entre les deux photosystèmes (Manodori et Melis, 1986).

Une dégradation des phycobilisomes peut permettre de récupérer et recycler les acides aminés en protéines aidant dans le processus d'acclimatation et peut être importante afin de prévenir des dommages cellulaires causés par la photo-oxydation.



## CHAPITRE IV

### IV. LA FLUORESCENCE

#### 4.1 . Dissipation de l'énergie lumineuse et fluorescence:

Lorsqu'un pigment absorbe l'énergie d'un photon et entre dans un état d'excitation électronique, 4 voies de dissipations de l'énergie sont possibles.

- sous forme non radiative (chaleur) (Ruban et Horton, 1998; Pospisil, 1997; Krause et Behrend, 1986).
- en subissant une transduction de l'énergie lumineuse en énergie chimique (potentiel réducteur). Cette transduction de l'événement photochimique et qui implique des réactions d'oxydo-réduction est le processus le plus important de la photosynthèse (Krause et Weis, 1991).
- sous forme radiative (fluorescence) et provient du PSII (0.6%-3%) (Krause et Weis, 1991).
- transfert des antennes du PSII vers le PSI afin de redistribuer l'énergie entre les deux photosystèmes (Fork et Satoh, 1986).

L'énergie lumineuse captée peut exciter le centre réactionnel de la chlorophylle, lui enlever des électrons qui se déplaceront le long de la chaîne de transport des électrons et servir à la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique (photochimie). L'énergie excédentaire peut être ré-émise sous forme de chaleur, ce qui protégerait les protéines du PSII contre la dégradation (Pospisil, 1997). L'énergie captée peut être ré-émise directement sous une forme moins énergétique, c'est la fluorescence. L'énergie excédentaire peut aussi, et c'est particulièrement vrai avec les cyanobactéries, être partagée entre les deux photosystèmes I et II. La mobilité du PSII dans la membrane permet le transfert d'une partie de l'énergie au PSI. Toutes ces formes de dissipation de l'énergie lumineuse incidente sont liées et une atteinte au niveau d'un de ces procédés amène un changement à un autre niveau. Une baisse de la photochimie, par exemple, peut amener une hausse du niveau de la fluorescence. La fluorescence, qui représente environ 2% de l'énergie dissipée du PSII (Maxwell et Johnson,

2000), est un bon indicateur de l'état physiologique de la plante ou de tout autre organisme photosynthétique. Le niveau de fluorescence peut être mesuré avec différents fluorimètres tels que le PAM (Pulse-Amplitude-Modulated) ou le PEA (Plant Efficiency Analyser) et servir à détecter les effets de certains stress sur la capacité photosynthétique de l'organisme.

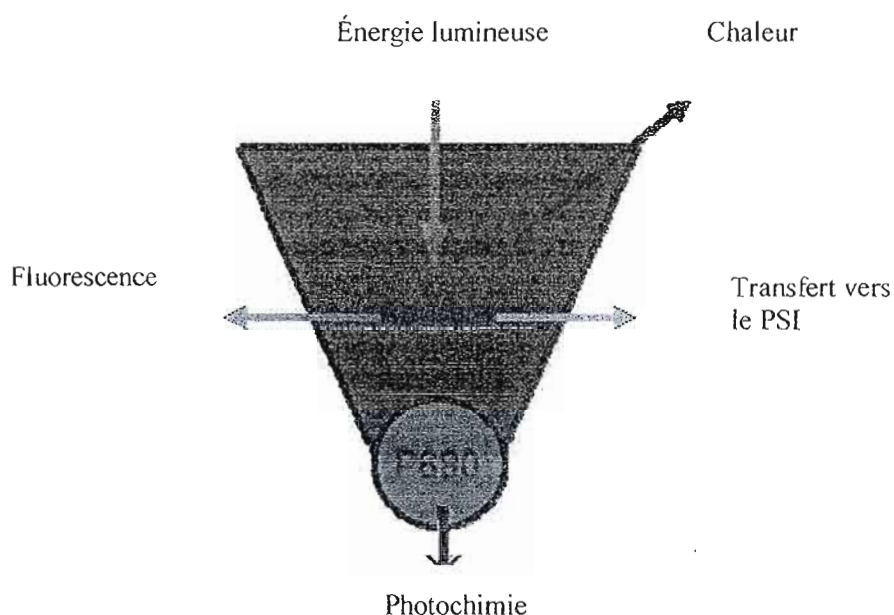


Figure 4.1. Voies dissipatives de l'énergie lumineuse captée.

#### 4.2. Principes à la base de l'analyse au Pulse Amplitude modulated (PAM).

Il faut savoir que niveau de fluorescence et phénomène de transport des électrons à la base de la photochimie sont fortement liés. Tout corps émet une fluorescence basale. Lorsque le PSII est oxydé (ouvert), il n'y a qu'une fluorescence minimale émise appelée  $F_0$  (Van Kooten et Rosenquist, 2003) et qui est une fluorescence intrinsèque à la chlorophylle.

Lorsque le transport des électrons est bloqué par un inhibiteur du transport des électrons quelconque, le DCMU par exemple (Figure 4.2), le PSII reste fortement réduit, ce qui amène



une hausse de la fluorescence. Les électrons ne pouvant entamer leur trajet au long de la chaîne de transport des électrons, entraînent ainsi une réduction progressive du PSII, puis créent une «congestion» au niveau du PSII, une excitation et réduction continues de ce dernier, d'où la hausse de la fluorescence jusqu'à un niveau maximal appelé  $F_M$  (fluorescence maximale).  $F_M$  représente la réduction complète du PSII. Par contre, un transport des électrons sans entrave présente une cinétique de fluorescence variable standard (Figure 4.2.). Un organisme photosynthétique ayant été adapté à la noirceur, lorsque irradié, présente une hausse rapide du signal de la fluorescence puis une baisse jusqu'à l'atteinte d'un état d'équilibre. Cette baisse (*quenching*) de la fluorescence est due à une photochimie accrue ainsi qu'à l'activation de procédés de dissipation énergétique de type non-radiatif (Bilger et Schreiber, 1986; Bilger *et al.*, 1988; Krause et Jahns, 2001). Il faut savoir que les processus impliqués dans le cycle de Calvin sont lents lorsque comparés au flux de lumière incidente. Pour cette raison, l'ATP et le NADPH s'accumulent dans le stroma, et ce, tout spécialement lorsqu'une plante a été placée un certain temps à la noirceur et que tous les processus sous-tendant le cycle obscur sont arrêtés. Un changement très rapide des conditions lumineuses comme l'exposition à une lumière brillante après une noirceur complète ne peut être régulée immédiatement. Le gradient électrochimique à travers la membrane du thylacoïde monte car l'ATP et le NADPH produits par ce gradient ne sont pas consommés immédiatement dans le cycle de Calvin. Ceci entraîne une baisse rapide et drastique du pH dans le lumen du thylacoïde (intérieur) ce qui entrave le passage des électrons et des protons de la plastoquinone au complexe cytochrome *b<sub>6</sub>/f*. Le PSII se voit alors fortement réduit car les électrons ne sont pas encore entraînés dans la chaîne de transport des électrons. Lorsque la plupart des unités PSII sont ouvertes (oxydées) la photochimie est la principale voie de dé-excitation de la chlorophylle, mais lorsque le PSII se voit réduit graduellement, la dé-excitation se fait via la fluorescence, créant le pic de la courbe de cinétique Kautsky. Peu à peu, les enzymes impliquées dans la fixation du CO<sub>2</sub> sont activées, accélérant le processus de fixation, augmentant par le fait même la demande en ATP et NADPH provenant de la chaîne de transport des électrons, et par conséquent, le flux des électrons. Le PSII se voit progressivement réduit jusqu'à l'atteinte d'un équilibre ( $F_s$ ). La baisse de la courbe de fluorescence est appelée effet Kautsky, du nom du découvreur de ce phénomène en 1931 (Kautsky et Hirsch, 1931).

### 4.3. Paramètres du PAM

La méthode fluorométrique PAM (Pulse-Amplitude-Modulated) est utilisée couramment pour l'étude de la photosynthèse et est adéquate pour fournir des paramètres montrant l'état du transport des électrons ainsi que pour mettre en évidence les processus de dissipation énergétique se passant dans le système photosynthétique (Juneau *et al.* 2001). Dans une courbe d'induction de la fluorescence obtenue avec le PAM, certaines valeurs de fluorescence sont mises en évidence telles que  $F_o$ ,  $F'_o$ ,  $F_M$ ,  $F'_M$ ,  $F_s$ . Ces données serviront aux calculs des paramètres  $\Phi_M$ ,  $\Phi'_M$ ,  $q_p$ ,  $q_N$ ,  $q_{p\text{ rel}}$ ,  $q_{N\text{ rel}}$ , NPQ et  $UQF_{\text{rel}}$ .

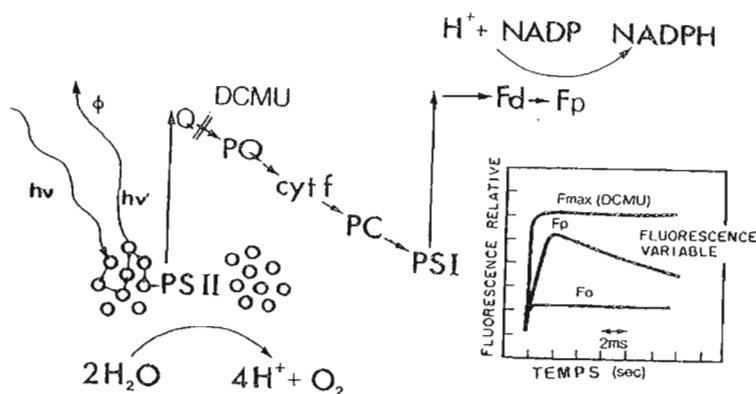


Figure 4.2. Relation entre la fluorescence et le transport des électrons. Un blocage du transport des électrons par un inhibiteur du PSII tel que le diuron entraîne une ré-émission de la fluorescence de façon maximale car l'énergie ne peut être dissipée via la photochimie ( $F_{\text{max}}$  sur la figure).  $F_o$  est la fluorescence intrinsèque de la chlorophylle du PSII.

$F_o$  est la fluorescence de base, intrinsèque, de la chlorophylle  $a$  adaptée à la noirceur tandis que  $F'_o$  est la fluorescence minimale lorsqu'il y a eu adaptation à la lumière. Au niveau  $F_o$  (ainsi que  $F'_o$ ) tous les centres réactionnels de PSII sont ouverts et  $Q_A$  est complètement oxydé (Van Kooten et Rosenquist, 2003).

$F_M$  est la fluorescence maximale du PSII. Le PSII est complètement réduit, ou fermé, lorsque la fluorescence atteint le niveau  $F_M$ .  $F'_M$  est la fluorescence maximale après adaptation à la lumière.

F<sub>s</sub> représente la fluorescence lorsqu'un équilibre est atteint dans le transport des électrons le long de la chaîne de transport des électrons.

Comme il a été dit précédemment, ces données servent à calculer les paramètres indiquant la capacité de transport des électrons ainsi que les différentes voies de dissipation de l'énergie.

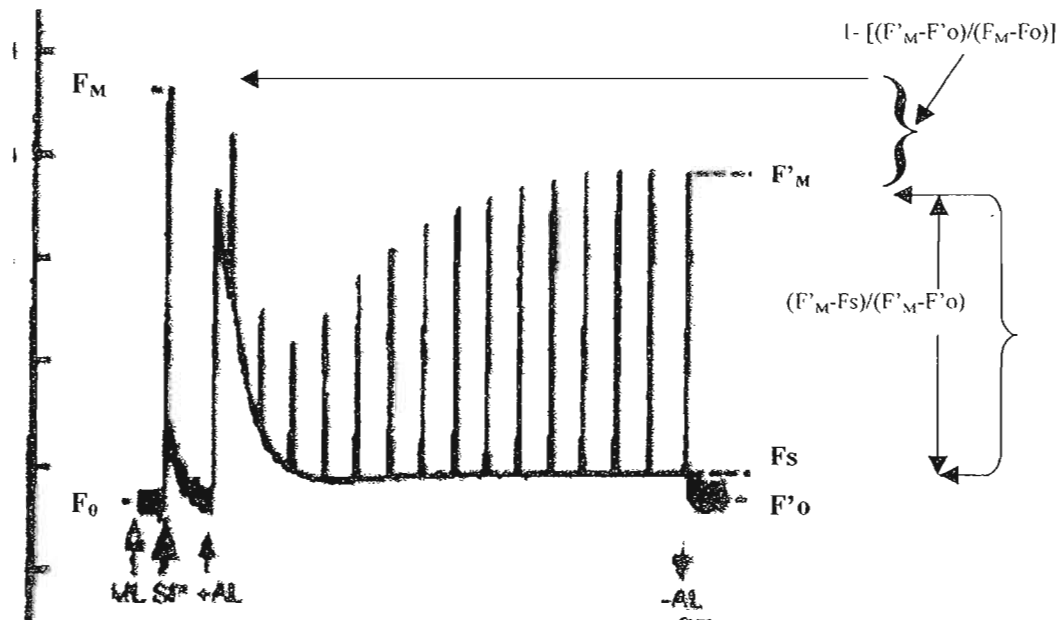
#### 4.3.1. Les paramètres liés aux mesures de fluorescence faites au PAM

- $\Phi_M = (F_M - F_o) / F_M$  Genty *et al.*, 1989
- $\Phi'_M = (F'_M - F_s) / F'_M$  Genty *et al.*, 1989
- $q_p = (F'_M - F_s) / (F'_M - F'o)$  Schreiber *et al.*, 1986
- $q_N = 1 - [(F'_M - F'o) / (F_M - F_o)]$  Schreiber *et al.*, 1986
- $NPQ = (F_M - F'_M) / F'_M$  Bilger et Björkman, 1990
- $q_{p\ rel} = (F'_M - F_s) / (F_M - F'o)$  Buschmann, 1995
- $q_{N\ rel} = (F_M - F'_M) / (F_M - F'o)$  Buschmann, 1995
- $UQF_{rel} = (F_s - F'o) / (F_M - F'o)$  Juneau *et al.*, 2005

$\Phi_M$  correspond à l'efficacité maximale du PSII adapté à la noirceur tandis que  $\Phi'_M$  correspond à l'efficacité opérationnelle du PSII lorsqu'il y a transport d'électrons. Ces paramètres servent à mettre en évidence la capacité de l'organisme photosynthétique à transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique (Bolhàr-Nordenkamp *et al.* 1989).

Le *quenching* photochimique ( $q_p$ ) (Figure 4.3) représente la baisse de fluorescence qui est relative à la photochimie tandis que le *quenching* non-photochimique ( $q_N$ ) est la baisse de fluorescence qui représente la dissipation sous forme de processus non-radiatif (chaleur) (Schreiber, 1983). Le paramètre NPQ est une autre façon de présenter ce phénomène, mais parce que le facteur  $F_o$  peut être difficile à mesurer dans les conditions qui prévalent sur le terrain (Frankart *et al.*, 2003), le *quenching* non-photochimique (NPQ) peut être utilisé au lieu du  $q_N$ .

Les *quenches* peuvent être calculés d'une façon relative ( $q_{p\ rel}$  et  $q_{N\ rel}$ ) (Buschmann, 1995), en ayant un dénominateur commun composé des valeurs extrêmes de la cinétique telles que  $F_M$  et  $F'o$ .



(Juneau *et al.*, 2001)

Figure 4.3. Courbe de cinétique d'induction de fluorescence PAM. Les différentes lumières utilisées sont indiquées : ML= lumière modulée; SP= lumière saturante (saturating pulse); AL=lumière actinique; FR= lumière rouge (far-red). Les différentes lumières servent à : ML= lumière modulée n'induisant pas le transport des électrons et servant aux mesures des variations de fluorescence; SP= «flash» de lumière qui sert à réduire complètement le PSII et à obtenir le  $F_M$  ou la fluorescence maximale du PSII, il sert aussi à montrer l'état de la photochimie au long de la cinétique de fluorescence ( $q_P$ ); AL= induit le transport des électrons et permet la cinétique de fluorescence; FR= sert à ré-oxyder complètement le PSII et à obtenir le  $F'o$ .  $F'_M$  est la fluorescence maximale lorsqu'il y a transport des électrons.  $F_0$  est la fluorescence intrinsèque de la chlorophylle lorsqu'il n'y a pas exposition à la lumière.  $F'o$  est la fluorescence minimale dans un état adapté à la lumière.

$UQF_{rel}$  est un nouveau paramètre qui est un indicateur de l'état d'oxydo-réduction du PSII et il peut, par conséquent, donner une indication de l'efficacité du PSI à drainer les électrons en provenance du PSII (Juneau *et al.*, 2005). Il peut aussi représenter le niveau de réduction du PSII dans certaines conditions stressantes. On se rappelle que l'énergie peut se dissiper sous forme de chaleur ( $q_N$ ), sous une forme photochimique ( $q_P$ ) et sous forme de fluorescence.  $UQF_{rel}$  représenterait la dissipation de l'énergie lumineuse sous forme de fluorescence.

#### 4.4. Paramètres du Plant Efficiency Analyser (PEA).

Le PEA mesure les tout premiers instants du transport électronique à l'intérieur du PSII. Un «flash» de forte intensité mais de très courte durée ne permet pas le transport en continu des électrons le long de la chaîne de transport des électrons. Leur mouvement ne se fait qu'à l'intérieur du PSII jusqu'à la  $Q_B$ . Nous obtenons ainsi un instantané du flux d'électrons le long des transporteurs primaires à l'intérieur du PSII jusqu'à l'obtention du niveau P qui correspond au niveau  $F_M$ .

La cinétique de fluorescence obtenue est familièrement appelée courbe OJIP et chacun des points d'inflexions de la courbe correspond à un état précis d'oxydo-réduction des quinones A et B. Le O correspond au  $F_0$  donc à l'oxydation complète des quinones (Lazar, 2003), les paliers J, I et P correspondent à des niveaux divers d'oxydo-réduction de chacune des quinones (Strasser et Strasser, 1995) (Figure 4.4.). À travers les variations de la courbe de cinétique rapide nous pouvons obtenir des informations sur les effets de divers stress; on peut, par exemple, déterminer à quel endroit un stress chimique produit un blocage du transport des électrons à l'intérieur du PSII.

Les mesures faites au PEA fournissent les valeurs ci-dessous qui permettent par la suite de calculer des paramètres (Tableau 4.1) mettant en évidence les effets des différents stress chimiques sur la photosynthèse.

- O= Intensité de fluorescence de base correspondant au niveau  $F_0$  ( $t=50\mu s$ )
- $F_{300\mu s}$ = Intensité de fluorescence à 300  $\mu s$  de  $F_0$
- J= Intensité de fluorescence à 2 ms
- I= Intensité de fluorescence à 30 ms
- P=Fluorescence maximale ou  $F_M$

(Strasser et Strasser, 1995)

#### 4.5. Effets des stress sur le transport des électrons et la cinétique de fluorescence.

Les effets nocifs des herbicides entraînent une hausse du niveau de la fluorescence et une baisse de l'efficacité photosynthétique de la plante ou de tout autre organisme photosynthétique. L'effet des herbicides résulte en une modification *in vivo* des schémas de fluorescence des organismes photosynthétiques, ce qui peut être détecté par le système de fluorométrie PAM (Dorigo et Leboulanger, 2001). Les paramètres de fluorescence donnent des indications fiables sur l'effet des polluants sur l'état physiologique des plantes (Bolhàr-Nordenkamp *et al.*, 1989; Schreiber *et al.*, 1994). L'analyse détaillée de la fluorescence de la chlorophylle *a* et l'application de l'analyse des *quenchings* grâce au fluorimètre PAM permet la discrimination des différents modes d'action des pesticides.

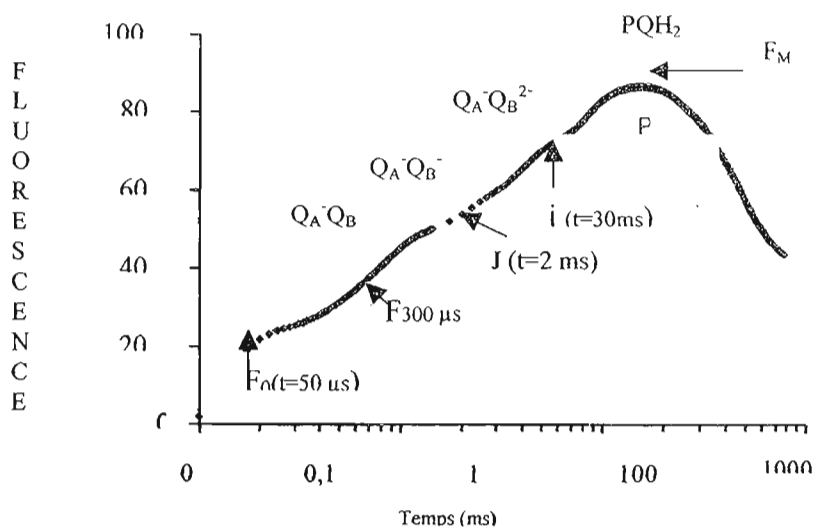


Figure 4.4. Courbe de cinétique rapide (OJIP-test). Les différentes inflexions de la courbe correspondent aux  tats d'oxydo-réduction des quinones du PSII.   partir de ce type de courbe, il est possible de déterminer où se situe l'action d'un herbicide sur le PSII.

(Adapté de Strasser et Strasser, 1995)

Tableau 4.1. Quelques paramètres biophysiques obtenus grâce au PEA.

Mo	Ratio de PSII fermés	$[4 * (F_{300\mu s} - F_{50\mu s}) / (F_M - F_{50\mu s})]$
Vj	Fluorescence variable à 2 ns ou proportion de centres réactionnels fermés	$[(F_{2ms} - F_{50\mu s}) / (F_M - F_{50\mu s})]$
ABS/RC	Flux énergie spécifique absorbé par CR* ou Grosseur des antennes	$(Mo/Vj) * [1 / (F_v/F_M)]$
ETo/RC	Transport électrons dans CR actif	$(Mo/Vj) * (1 - Vj)$
Tro/RC	Ratio maximal de captation des électrons par PSII	$(Mo/Vj)$
Dlo/RC	Dissipation énergétique au niveau de la chlorophylle antennaire	$ABS/RC - Tro/RC$
RC/ABS	Fraction de CR actifs par absorption totale	$[(F_{2ms} - F_{50\mu s}) / 4(F_{300\mu s} - F_{50\mu s})] * F_v/F_M$
RC/CS	Nombre CR actifs par section transversale du PSII	$(ABS/CS * Tro) / (ABS * RC / Tro)$ ou $F_M * PHI_{p0} * V_j / M_o$
$PHI_{p0}$	$\Phi_M$	$Tro/ABS$ ou $F_v/F_M$ ou $[1 - (F_o/F_M)]$

- CR= centres réactionnels

(Appenroth *et al.*, 2001; Force *et al.*, 2003; Van Heerden *et al.*, 2004)

Le blocage du transport des électrons, l'action des découplants et l'action caractéristique des composés nitro-aromatiques sur le *quenching* de la fluorescence peuvent être distingués (Brack et Hartmut, 1998). Par exemple, on sait que l'atrazine affecte la photosynthèse à cause de son interaction au site  $Q_B$  inhibant le transport des électrons le long de la chaîne de transport des électrons (Conrad *et al.*, 1993). Ceci amène une sur-excitation du PSII et une hausse du niveau  $F_s$  (steady state level) (Frankart *et al.*, 2003). Les baisses des valeurs des paramètres  $\Phi'_M$ ,  $q_P$  et NPQ ont aussi été notées avec *Lemna minor* exposée à de l'atrazine (Frankart *et al.*, 2003). Dans l'étude de Juneau *et al.*, 2001, on constate qu'après 48 heures d'exposition au métolachlore, le transport des électrons était affecté chez l'algue verte *Ankistrodesmus falcatus*.

On note une forte augmentation de  $q_N$  (75%) chez cette algue après 48 heures tandis que chez *Microcystis aeruginosa* le  $q_N$  n'augmente pas.

#### 4.6. Défense des organismes photosynthétiques.

Au cours de l'évolution, les plantes ont développé des moyens efficaces pour se protéger des dommages induits par les hautes luminosités. Un de ceux-ci est la proximité de la chlorophylle avec des molécules de caroténoïdes qui peuvent dissiper l'énergie excédentaire de la chlorophylle (Rutherford et Krieger-Liszkay, 2001). Les espèces photosynthétiques limitent la formation des états triplets de la chlorophylle en assurant que toutes les molécules de chlorophylle soient bien liées aux sites qui leur sont spécifiques dans les protéines membranaires, où elles s'arrangent de telle sorte que l'énergie de la lumière absorbée est utilisée efficacement afin de permettre le transfert des électrons. Quelques plantes sont capables d'ajuster leur capacité de captation des rayons lumineux à travers des mouvements foliaires et chloroplastiques (Müller *et al.*, 2001). Durant une acclimatation à des changements d'intensité lumineuse sur une longue période, plusieurs algues et plantes régulent la grosseur de leurs antennes collectrices de lumière à travers des changements dans l'expression de leurs gènes et/ou de la protéolyse. Les intensités lumineuses varient tout au long d'une journée et, de plus, la plupart des plantes reçoivent plus de lumière qu'elles n'en ont besoin. Dans ces conditions, la régulation de la captation de la lumière est essentielle afin de balancer l'absorption et l'utilisation de l'énergie lumineuse afin de minimiser le potentiel de dommages photo-oxydants. Mais le risque de cet état singulet est toujours possible. D'où la nécessité d'avoir d'autres voies de dissipation de l'énergie et des voies de protection contre les espèces réactives oxygénées.

Les plantes et algues possèdent des mécanismes pour se débarrasser de l'énergie excédentaire comme des mécanismes de protection non-photochimiques qui diminuent les chlorophylles excitées singulet, relâchant ainsi l'excès d'énergie sous forme de chaleur. Ces *quenchant non-photochimiques* (NPQ) existent dans presque tous les organismes photosynthétiques eucaryotes et ils les aident à réguler et à protéger la photosynthèse dans les environnements où l'absorption de l'énergie excède la capacité d'utilisation de la lumière.

Le *quenching photochimique* ( $q_P$ ) représente la baisse de fluorescence qui est relative à la photochimie tandis que le *quenching non-photochimique* (NPQ ou  $q_N$ ) est la baisse de



fluorescence qui représente la dissipation sous forme de processus non-radiatif (chaleur) (Schreiber, 1983). Ainsi,  $q_P$  et NPQ aident à minimiser la production de  $^1O_2^*$  dans l'antenne du PSII. NPQ ou  $q_N$  peut être subdivisé en trois composantes :  $q_E$ ,  $q_T$  et  $q_I$  (Müller *et al.*, 2001).

$q_E$  : La composante majeure et la plus rapide chez la plupart des plantes et des algues. Cette composante est énergie-dépendante et requiert un gradient de proton. La baisse du pH dans le lumen lors d'une illumination excessive active l'interconversion de pigments spécifiques (des caroténoïdes oxygénés) liés généralement aux protéines des antennes collectrices de lumière, induisant ainsi un changement de conformation. Le processus est suffisamment rapide pour pallier aux variations d'intensité lumineuse naturelle, tel qu'un passage de nuages, par exemple. Le quenching énergie-dépendant ( $q_E$ ) n'est pas un grand contributeur au  $q_N$  chez les cyanobactéries (Campbell *et al.*, 1998). Il semblerait que la voie  $q_T$  soit privilégiée.

$q_T$  : La deuxième composante du NPQ, le *quenching* relatif aux transitions d'état, se trouve principalement dans les algues et peu dans les plantes lors de l'exposition à une trop forte intensité lumineuse. L'antenne collectrice de lumière principale se sépare du PSII et réduit, par le fait même, la quantité d'excitation dirigée vers le PSII. Elle agit en quelques minutes.

Chez les cyanobactéries, un haut  $q_N$  ne signifie pas nécessairement une basse efficacité photochimique (Campbell, 1998; Sundberg *et al.*, 1997). En fait, la redistribution de l'énergie du supracomplexe phycobilisome-PS II au PSI est un mécanisme important de régulation chez les cyanobactéries afin d'accommoder les changements dans l'excitation (Schubert *et al.*, 1995) ou les besoins en ATP, pour accumuler le  $CO_2$  et les nutriments (Miller *et al.*, 1991; Badger et Schreiber, 1993; Romero *et al.*, 1992). Dans l'étude de Ibelings *et al.*, (1994), le *quenching non-photochimique* chez une souche de *Microcystis* a été interprété comme une indication de la dissipation de l'énergie d'excitation sous forme de chaleur. Les cyanobactéries peuvent connaître deux états appelés état I et état II. Lorsque la chaîne est réduite, les cellules tendent à être dans l'état II avec un niveau de fluorescence du PSII bas et une distribution de l'énergie d'excitation au PSI, ce qui extrait des électrons de la chaîne de transport des électrons. Si la chaîne devient plus oxydée, les cellules basculent dans l'état I avec un rendement de la fluorescence du PSII plus élevé et plus d'énergie d'excitation distribuée au PSII (Campbell *et al.*, 1998). Il semble que l'état II dans des cyanobactéries adaptées à la lumière implique une inactivation du complexe de dégagement d'oxygène qui scinde une molécule d'eau et fournit l'électron pour régénérer le P680 (centre réactionnel du PSII) oxydé. Ceci limite

l'approvisionnement en électrons au P680 et permet une recombinaison dans le centre réactionnel, diminuant les valeurs absolues de  $q_N$ .

$q_I$  : Cette composante de NPQ présente la relaxation la plus lente (heures) et elle serait un mélange de photoinhibition de la photosynthèse et de photodommages. La photoinhibition est détectée lorsque le niveau de la fluorescence intrinsèque à la chlorophylle ( $F_0$ ; fluorescence basale) monte et que le niveau maximal de fluorescence ( $F_M$ ; centre PSII complètement réduit) diminue tandis que dans le cas du *quenching* photo-protecteur,  $q_E$ ,  $F_0$  diminue en proportion directe avec  $F_M$ . Cette composante est généralement négligeable.

## CHAPITRE V

### V. MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 5.1. Matériel biologique.

Les organismes testés consistent en des cyanobactéries provenant de la collection de culture de l'Université de Toronto (UTCC). *Microcystis aeruginosa* (UTCC 299) est une cyanobactérie qui produit une toxine appelée microcystine (415 µg microcystine /g poids sec) et qui est hépatotoxique pour les organismes aquatiques ainsi que pour les humains lorsque retrouvée en trop grande concentration dans l'eau potable. La souche 299 de l'UTCC a été isolée de Pretzlaff Pond, Alberta, Canada, Août 7/90. Une autre souche de *Microcystis aeruginosa* (UTCC 632) ne produit pas, quant à elle, de toxine. UTCC 632 provient de l'UTEX (UTEX LB 2061). *M. aeruginosa* a été incubée à une température de 23°C dans une chambre de croissance Conviron à une intensité lumineuse de 50 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (combinaison de tubes fluorescents « cool-white » et de bulbes incandescents) avec un cycle jour-nuit, 16h/8h. Avant tout, il faut utiliser des algues dans des conditions optimales de croissance. À partir de mesures de la croissance, une courbe de croissance sera faite et permettra de déterminer la phase de croissance exponentielle qui est la partie de la courbe (partie linéaire de la courbe) où la croissance est optimale.

Pour calculer les différents taux de croissance, la formule suivante a été utilisée :

$$\text{pente} = \frac{\ln \text{ du nombre de cellules au jour } J_N - \ln \text{ du nombre de cellules jour } J_{t=0}}{J_N - J_{t=0}}$$

Dans la formule, nous avons utilisé les temps de  $J_N=4$  jours et  $J_{t=0}=0,21$  jours.

Toutes les cyanobactéries utilisées lors des tests étaient dans leur phase de croissance exponentielle.

La croissance des cellules a été mesurée au Coulter Counter Multisizer III de la compagnie Beckmann. Lors des tests, chaque *inoculum* avait une concentration de 250 000 cellules/mL. Les changements au niveau de la grosseur des cellules ont été mesurés avec le même système.

Le comptage de cellules permet de déterminer de façon quantitative la croissance des cyanobactéries.

## 5.2. Milieu de culture

Le milieu de culture consiste en une version modifiée du Bold's basal medium (BBM) pH 6.8 (Stein, 1973). La solution vitaminique F/2 a été ajoutée au milieu de culture.

Produits utilisés	Solutions mères	nombre de ml/Litre
1. $\text{KH}_2\text{PO}_4$	8.75 g/500 ml	10 ml
2. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.25 g/500 ml	10 ml
3. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.75 g/500 ml	10 ml
4. $\text{NaNO}_3$	12.5 g/500 ml	10 ml
5. $\text{K}_2\text{HPO}_4$	3.75 g/500 ml	10 ml
6. $\text{NaCl}$	1.25 g/500 ml	10 ml
7. $\text{Na}_2\text{EDTA}$	10 g/L	1 ml
KOH	6.2 g/L	
8. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.98 g/L	1 ml
$\text{H}_2\text{SO}_4$ (conc.)	1 ml/L	
9. Trace Metal Solution	See below*	1 ml
10. $\text{H}_3\text{BO}_3$	5.75 g/500 ml	0.7 ml

### Solution de métaux traces

Substances	g/Litre
$\text{H}_3\text{BO}_3$	2.86 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.81 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.222 g
$\text{Na MoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.390 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.079 g
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0494 g

Solution vitaminique F/2 (1ml/Litre de milieu de culture):

1 Vitamine B12 (Cyanocobalamine)	5mg/5mL d'eau distillée
2. Biotine	1 mg/10mL d'eau distillée

quantité ajoutée dans 100 mL d'eau distillée

1. Vitamin B12	0,1 mL
2. Biotin	1,0 mL
3. Thiamine HCl	20 mg

### 5.3. Tests sur les effets des herbicides sur la photosynthèse de *Microcystis aeruginosa*.

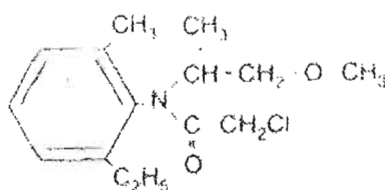
Il s'agit de tester les effets de différents herbicides commerciaux couramment utilisés dans la culture du maïs sur la photosynthèse de *Microcystis aeruginosa*, qu'elle soit productrice de toxine ou non productrice de toxine. Ces tests de sensibilité à divers herbicides seront aussi faits afin de déterminer si ces souches présentent des sensibilités différentes face aux herbicides utilisés. Les mesures seront faites en triplicata.

#### 5.3.1. Herbicides

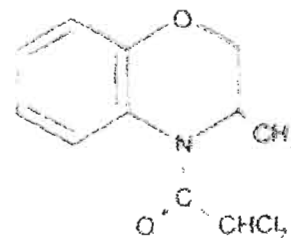
Les herbicides utilisés sont le Dual magnum et le Dual II magnum fournis par Syngenta [ $\alpha$ -métolachlore: 915 g/L (86 % p/p)], le Primextra II magnum de Syngenta [mélange  $\alpha$ -métolachlore: 400 g/L (35,8 % p/p) et atrazine: 313 g/L (28,7 % p/p)], l'Aatrex (atrazine 480 g/L) fourni par Syngenta. De plus, une reconstitution de Primextra sans phytoprotecteur a été faite à partir de Dual magnum et d'Aatrex. Le phytoprotecteur (*safener*) Benoxacor (Syngenta) est présent dans les solutions herbicides Dual II magnum (4 % p/p) et Primextra II magnum (1,8 % p/p). Du Benoxacor (Sigma) a été dissous dans du méthanol 80% avec une concentration finale de 0,05% (vol/vol).

Tableau 5.1. Nomenclature IUPAC des herbicides et phytoprotecteur utilisés.

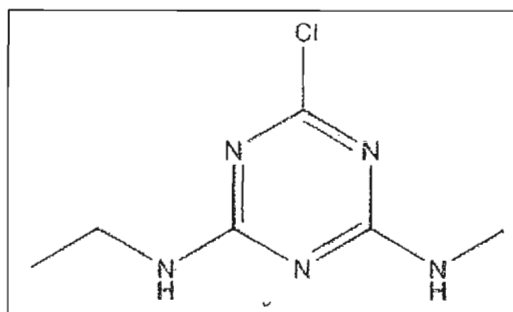
Métolachlore	Atrazine	Benoxacor
CAS No. 87392-12-9	CAS No. 1912-24-9	CAS No. 98730-04-2
(1S)-2-chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-(2-methoxy-1-methylethyl)acetamide	2-chloro-4-(ethylamino)-6-(isopropylamino)-s-triazine	4-(Dichloroacetyl)-3,4-dihydro-3-methyl-2H-1,4-benzoxazine



MÉTOLACHLORE



BENOXACOR



ATRAZINE

Figure 5.1. Structure des herbicides et phytoprotecteur utilisés.

Les concentrations utilisées lors des tests faits avec l'Aatrex et le Primextra II magnum sont de 0, 0,01, 0,05 et 0,1  $\mu\text{M}$  (Tableau 5.2.).

Les temps d'expositions pour l'Aatrex et le Primextra II magnum sont de 5, 24, 48 et 96 heures.

Tableau 5.2. Concentrations testées avec les herbicides Aatrex et Primextra II magnum.

Aatrex	Primextra II magnum
0 $\mu\text{M}$	0 $\mu\text{M}$
0,01 $\mu\text{M}$	0,01 $\mu\text{M}$
0,05 $\mu\text{M}$	0,05 $\mu\text{M}$
0,1 $\mu\text{M}$	0,1 $\mu\text{M}$

Les concentrations utilisées lors des tests faits avec le Dual et le Dual II magnum sont de 0, 0,097, 0,0485 et 0,97  $\mu\text{M}$  (Tableau 5.3.). Les temps d'expositions pour Dual et Dual II magnum sont de 0, 48 et 96 heures. Les mesures commencent au bout de 48 heures car le métolachlore a un effet moins rapide que celui des deux précédents herbicides (Tableau 5.2.).

Tableau 5.3. Concentrations testées avec les herbicides Dual et Dual II magnum.

Dual	Dual II magnum
0 $\mu\text{M}$	0 $\mu\text{M}$
0,097 $\mu\text{M}$	0,097 $\mu\text{M}$
0,0485 $\mu\text{M}$	0,0485 $\mu\text{M}$
0,97 $\mu\text{M}$	0,97 $\mu\text{M}$

Les concentrations d'atrazine sont celles qui déterminent les concentrations de métolachlore à tester. On a tenu compte du ratio atrazine / métolachlore qui existait dans le Primextra II magnum afin de respecter rigoureusement les conditions. Le ratio atrazine/métolachlore se trouvant dans le Primextra II magnum est de 1.451 M atrazine/ 1.409 M métolachlore.

Les mêmes témoins servent pour les tests avec le Dual magnum et le Dual II magnum. Pour faciliter la compréhension et pour les tableaux de résultats futurs, Dual magnum sera appelé D1 et le Dual II magnum sera appelé D2.

Tableau 5.4. Concentrations testées avec le Primextra reconstitué (atrazine+métolachlore), le Primextra reconstitué avec une concentration de Benoxacor de 2% (p/p) et, le Primextra reconstitué avec une concentration de Benoxacor de 4% (p/p). B représente Benoxacor.

Primextra reconstitué	Primextra reconstitué et ajout de 2% (p/p) benoxacor	Primextra reconstitué et ajout de 4% (p/p) benoxacor
0 $\mu$ M		
0,1 $\mu$ M	0,1 $\mu$ M + B2%	0,1 $\mu$ M + B4%

Les temps d'expositions pour le Primextra reconstitué (0,1  $\mu$ M), le Primextra reconstitué (0,1  $\mu$ M) avec un ajout de Benoxacor à une concentration de 2% (p/p) et le Primextra reconstitué (0,1  $\mu$ M) avec un ajout de Benoxacor à 4% (p/p) sont de 24 et 96 heures (Tableau 5.4.). Ces deux temps d'expositions ont été choisis à la lumière des résultats obtenus précédemment avec le Primextra II magnum et l'Aatrex.

Un test a été fait avec le Benoxacor seul en concentration de 2% (p/p) et un autre test a été fait avec 0,1  $\mu$ M d'Aatrex additionné de Benoxacor 2% (p/p). Le temps d'exposition est de 96 heures. L'effet le plus marqué se trouvant à 96 heures, pour les tests précédents faits avec le Primextra reconstitué avec le benoxacor, nous avons donc choisi ce temps d'exposition.

Des tests de vérification avec le méthanol seul ont été faits afin de vérifier que la substance, aux concentrations utilisées, n'influe pas sur les résultats.

#### 5.4. Tests fluorimétriques.

Les mesures de fluorescence ont été faites au fluorimètre WATER-PAM (Heinz Walz Instruments, Effeltrich, Germany) ainsi qu'au fluorimètre PEA (Plant Efficiency Analyser de



Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn Norfolk, GB.). Le WATER-PAM consiste en une unité émetteur-détecteur WATER-ED, une unité de contrôle PAM et en un logiciel WinControl Data. L'échantillon de 3 ml est placé dans une cuvette de quartz de 15 mm de diamètre. Il est illuminé par un arrangement circulaire de 14 diodes émettant dans le rouge avec le pic d'émission à 655 nm. Trois de celles-ci servent à la lumière modulée tandis que les autres servent pour la lumière actinique et les *flash* saturants. Tous les tests sont faits à température ambiante. L'intensité de la lumière actinique utilisée avec le PAM est de  $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  tout comme celle utilisée lors de la croissance des cyanobactéries afin d'éviter le phénomène de photo-inhibition et pour obtenir les conditions optimales pour l'activité photosynthétique. La lumière saturante permet la fermeture complète du PSII afin d'obtenir les valeurs de fluorescence maximale (Bolhàr-Nordenkampf *et al.*, 1989) et de déterminer les différents *quenchings*. Les pulsations lumineuses sont faites aux 60 secondes. Une adaptation à la noirceur de 20 minutes a été faite au préalable afin d'ouvrir complètement les centres réactionnels du PSII. Les mesures ont été faites sur une période de 15 minutes. Afin de réduire complètement le PSII,  $0,30 \mu\text{M}$  de DCMU ont été ajoutés dans la cuvette à la fin des mesures au PAM afin d'obtenir le véritable  $F_M$  et d'obtenir les valeurs réelles de  $q_N$ . Les cyanobactéries sont connues pour avoir une dissipation non-photochimique même à la noirceur, ce qui explique un  $F_M$  sous-évalué.

La lumière utilisée pour les mesures au PEA est rouge et la longueur d'onde de la lumière utilisée pour l'excitation de la chlorophylle est de 685 nm. Les mesures faites au PEA sont faites sur une période de 6,0 secondes et l'intensité de la lumière pulsée est de  $3500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Pour les tests faits au PEA lors des traitements avec l'Aatrex, le Primextra II magnum, le Dual magnum (D1) et le Dual II magnum (D2), une même quantité de cellules a été filtrée sur un filtre  $1,2 \mu\text{m}$  de 13 mm de diamètre pour toutes les concentrations testées et tout au long des mesures. Pour les autres tests qui nécessitaient un ajout du Benoxacor, des tests au PEA en milieu liquide ont été faits. Les échantillons dans ce cas sont analysés directement et ne nécessitent pas de filtration. Les résultats obtenus avec les deux techniques ne diffèrent pas et s'équivalent. Une incubation à la noirceur de 20 minutes a été faite au préalable comme dans le cas du PAM.

### 5.5. Espèces réactives oxygénées.

Grâce à la cytométrie en flux (Facsan Becton-Dickinson) et les sondes appropriées, nous avons vérifié si l'exposition de la cyanobactérie aux herbicides amène une augmentation substantielle d'espèces réactives oxygénées (ERO).

Les oxydants formés durant la réduction de  $H_2O_2$  par les peroxydases oxydent le DCFH (2'-7'-dichlorofluorescéine), ce qui permet de détecter l'activité des peroxydases. La sonde DCFH-DA (2'-7'-dichlorofluoresceine diacétate) (Molecular Probes) est régulièrement utilisée et est connue pour être un bon indicateur pour suivre la génération d'espèces réactives oxygénées intracellulaire (Collèn et Davison, 1997; Ostrovidov *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2003; Simontachi *et al.*, 1993). Le DCFH-DA est plus spécifique aux peroxydes (Ostrovidov *et al.*, 2000). Cette sonde peut diffuser à travers la membrane cellulaire et elle a déjà été utilisée pour la détection de ERO chez une algue brune *Fucus evanescens* (Collèn et Davison, 1997). La technique utilisée pour ce projet sera celle de Malanga et Puntarulo, (1995), qui ont utilisé la même sonde pour *Chlorella vulgaris*. La fluorescence dans le surnageant est mesurée avec un appareil de cytométrie en flux avec une excitation de 488 nm et une émission de 525 nm. Une correction pour de l'autofluorescence (<10 %) est faite grâce à des blancs qui consistent au milieu de l'essai sans l'échantillon. Les valeurs de fluorescence sont arbitraires et ramenées en valeurs relatives. Lors des tests au FACscan, 10 000 cellules ont été utilisées pour la détection de la fluorescence du DCF en utilisant le paramètre FI-1 (Yoshida *et al.*, 2003).

La solution mère de DCFH-DA est de 0,5  $\mu M$  et consiste en DCFH-DA dissous dans de l'éthanol 100%.

La présence de ERO a été faite avec des échantillons contenant du DCFH-DA en concentration finale de 12,2  $\mu M$ . Le temps d'incubation à l'abri de la lumière fut de 15 minutes.

### 5.6. Dosage de la chlorophylle.

Lors des tests au PEA, deux filtres avec un nombre identiques de cellules ont été faits, l'un servant au test du PEA et l'autre étant gardé pour des dosages chlorophylliens ultérieurs des différents échantillons. L'extraction de la chlorophylle s'est faite pendant 7 minutes dans 4 mL d'éthanol 90% chauffé à 78°C. Les échantillons ont été gardés au froid et à la noirceur pendant 24 heures puis filtrés avec un autre filtre GFF pour se débarrasser des débris. Le volume filtré a

été mesuré à fins de calculs ultérieurs. Les lectures au spectrophotomètre UV se sont faites aux longueurs d'onde suivantes : 750 nm et 665 nm. Des mesures de blancs ont été faites et chacune des mesures a son équivalent traité avec HCl 0,1N. Toutes les mesures sont corrigées pour la turbidité avec la mesure faite à  $\lambda_{750}$ . Les calculs ont été faits avec la formule suivante :

$$\text{Chla}^* = \frac{(29.5 \times (A_{665} \text{ corrigé } \lambda_{750} - A_{665} + \text{acide corrigé } \lambda_{750})) \times \text{volume extraction (mL)}}{\text{Volume d'échantillon filtré(L)} \times \text{Longueur de la cuvette}}$$

( $\mu\text{g/L}$ )

\*chlorophylle *a*      A=absorbance       $\lambda$ = longueur d'onde  
(Lorenzen, 1967; Nusch, 1980; Wintermans et DeMots, 1965)

Il est à noter que les mesures au PEA et au PAM sont simultanées afin d'avoir les conditions les plus identiques possibles lors des mesures. De plus, la récolte des cellules pour les dosages de chlorophylle *a* a été faite en même temps que les mesures au PEA.

### 5.7. Spectres d'absorption.

Après filtration des échantillons, les filtres ont été resuspendus dans 1,5 mL de tampon phosphate 0,1 M à pH 6.8. Les échantillons ont été gelés dans de l'azote liquide pendant 3 minutes et dégelés par la suite, et ce, à trois reprises afin de lyser les cellules. Pour recueillir les phycobiliprotéines, les échantillons ont été centrifugés à 20 000 g pendant 15 minutes. Le surnageant a été utilisé pour la détection des différents pigments lors d'un spectre d'absorption réalisé avec un spectrophotomètre UV de marque Cary 300 avec double rayon. Le balayage s'est fait entre 300 et 750 nm. Les prises de données se sont faites à chaque 0,5 nm et à chaque 0,1 minute. Les échantillons ont subi une dilution 1/2 au préalable.

### 5.8. Statistiques.

Les statistiques ont été calculées grâce au logiciel JMPIN4 du SAS Institute (Cary, NC). Des régressions simples ont été faites ainsi que des two-way ANOVA (tests sur variables ROS et chlorophylle *a* par cellule avec les effets espèces et concentrations et leur interaction) et

ANCOVA (test sur variable ABS/RC avec les effets espèces et concentrations et leur interaction). Le seuil de probabilité est de  $P < 0,05$ . Des tests de HSD Tukey sont faits post-hoc à l'ANOVA afin de trouver quelles sont les moyennes significatives entre les groupes de traitements.

Les tests de Student ont été faits avec le logiciel Excel.

## CHAPITRE VI

### VI. RÉSULTATS ET DISCUSSION : UTCC 299

#### 6.1. AATREX.

##### 6.1.1. Croissance

On peut remarquer une très légère hausse de la croissance à faible concentration d'herbicide (0,010 $\mu$ M) puis une légère baisse de la croissance à plus haute concentration (0,10 $\mu$ M) lorsque UTCC 299 est exposée à de l'herbicide Aatrex pendant 96 heures (Tableau 6.1.1.).

Tableau 6.1.1. Taux de croissance selon le compte cellulaire, après 96 heures, de UTCC 299 exposée à 0, 0,01, 0,05 et 0,1  $\mu$ M d'herbicide Aatrex. Les mesures ont été faites au Coulter Counter. Les unités représentent le nombre de fois une population est doublée par jour (dble d<sup>1</sup>).

Jours	0 $\mu$ M	0,010 $\mu$ M	0,050 $\mu$ M	0,10 $\mu$ M
4	0,412 $\pm$ 0,013	0,437 $\pm$ 0,015	0,413 $\pm$ 0,001	0,400 $\pm$ 0,011

##### 6.1.2. Contenu en chlorophylle.

On note une hausse du contenu en chlorophylle *a* par cellules dans les cellules traitées par rapport au témoin à 24 heures (Figure 6.1.1.) et (Tableau A.1.). Puis à 96 heures, on note un retour des contenus en chlorophylle chez les cellules traitées au niveau du témoin. Le contenu en chlorophylle par volume est haussé à 24 heures (+34%) et reste plus élevé que le témoin à 96 heures (+26%) (Tableau 6.1.2.), ce qui indique assez peu d'atteinte à l'intégrité de la chlorophylle. Les différences tendanciellles entre les niveaux par cellule et par volume pourraient être expliquées par les variations de volume. En effet, les volumes des cellules traitées diminuent par rapport au témoin à 96 heures (Tableau 6.1.3.). En résumé, la croissance n'est pas notablement inhibée et le contenu cellulaire en chlorophylle *a* augmente à 24 heures pour rester légèrement plus élevé par rapport au témoin à 96 heures. On se trouve en présence

d'un «effet de verdissement» qui est une hausse de la quantité de chlorophylle dans les cellules, et ce, en présence de certains stress. L'atrazine est connu pour être une cause de verdissement chez les plantes exposées à cet herbicide (Tang *et al.*, 1997; Gonzalez-Barreiro *et al.*, 2004; Lürling et Roessink, 2006).

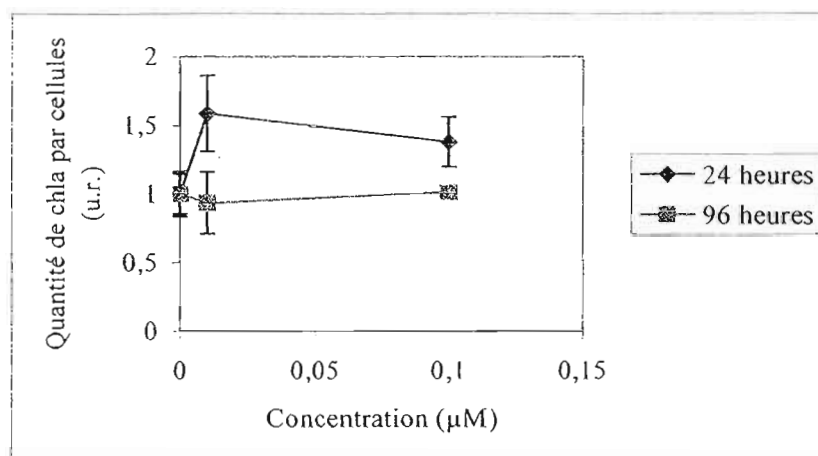


Figure 6.1.1. Quantité de chlorophylle *a* par cellule chez UTCC 299 exposée à 0, 0,01 et 0,1  M de Aatrex pendant 24 et 96 heures.

Tableau 6.1.2. Quantité de chlorophylle *a* par volume cellulaire chez UTCC 299 exposée à 0, 0,01 et 0,1  M de Primextra II magnum pendant 24 et 96 heures.

299 Aatrex		24 h	96 h
0 �M	$\mu\text{g}_{\text{chla}}/\mu\text{m}^3$	0,00124	0,00566
	écart-type	0,00023	0,00181
0,01 �M	$\mu\text{g}_{\text{chla}}/\mu\text{m}^3$	0,00195 *	0,00636
	écart-type	0,00029	0,00032
0,1 �M	$\mu\text{g}_{\text{chla}}/\mu\text{m}^3$	0,00166	0,00702 *
	�cart-type	0,00022	0,00010

\* significativement diff rent du témoin ( $P < 0,05$ )

Les différences entre les échantillons traités en ce qui a trait à la teneur en chlorophylle par cellule sont significatives à 24 heures pour les concentrations de 0,01  M et 0,05  M (données non montrées).   96 heures, seules les différences entre les concentrations 0,01 et 0,1  M sont significatives.

### 6.1.3. Volume cellulaire et granulosité.

À 24 heures, le volume cellulaire est peu atteint mais une baisse (-18%) de celui-ci est noté à 96 heures (Tableau 6.1.3) et (Annexe B.2.). On voit augmenter la granulosité des cellules témoins entre 24 heures et 96 heures (Figures 6.1.2. et 6.1.3.), ce qui pourrait indiquer une hausse de la quantité de chlorophylle dans les cellules (Gonzalez-Barreiro *et al.*, 2004). On pourrait penser que la quantité de phycobilisomes, qui sont des complexes relativement massifs et possédant de nombreuses surfaces diffractantes (Figure 3.7.), pourrait aussi être en augmentation. On remarque une baisse de 30% de la granulosité cellulaire chez UTCC 299 exposée à 0,1  $\mu\text{M}$  d'Aatrex pendant 96 heures (Figure 6.1.3.), ce qui pourrait être dû à la baisse de la concentration en chlorophylle, ou même, en phycobilisomes. Ceci sera discuté plus tard dans la section traitant de l'herbicide Primextra II magnum.

Tableau 6.1.3. Volume cellulaire de UTCC 299 exposée à 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  d'Aatrex pendant 24 heures et 96 heures.

Traitement	Volume (u.r.)	
	24 heures	96 heures
Témoins	1	1
Écart-type	$\pm 0,012$	$\pm 0,026$
0,1 $\mu\text{M}$	0,964	0,816*
Écart-type	$\pm 0,043$	$\pm 0,043$

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

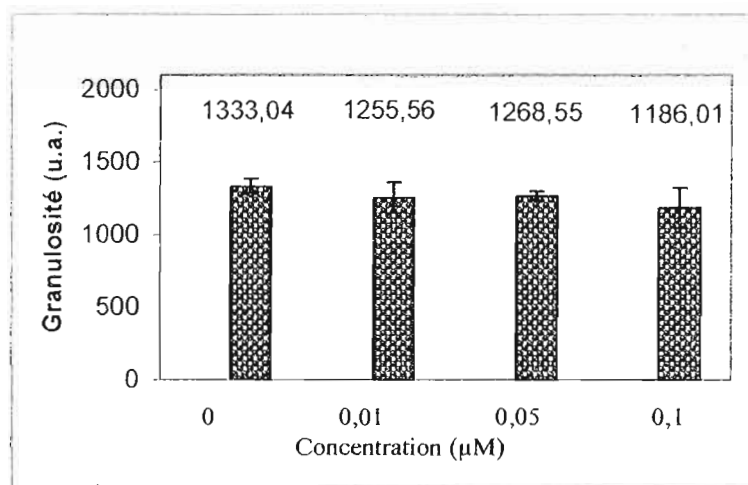
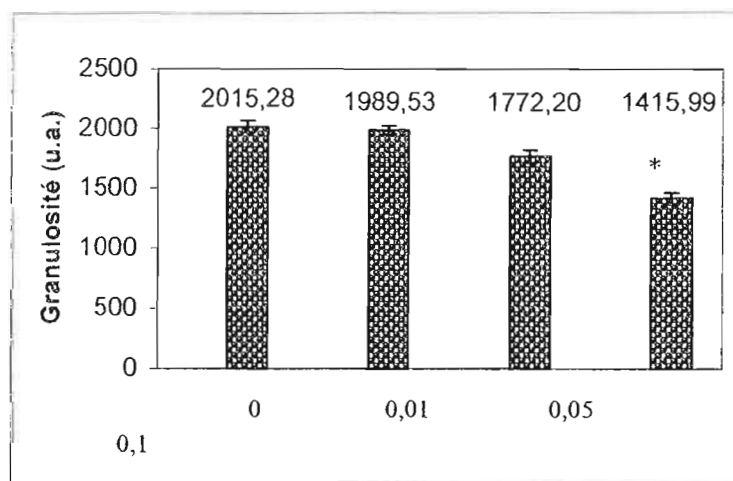


Figure 6.1.2. Granulosité des cellules de *Microcystis* UTCC 299 exposée pendant 24 heures à 0, 0,01, 0,05 et 0,1 µM d'Aatrex. Les unités sont arbitraires.



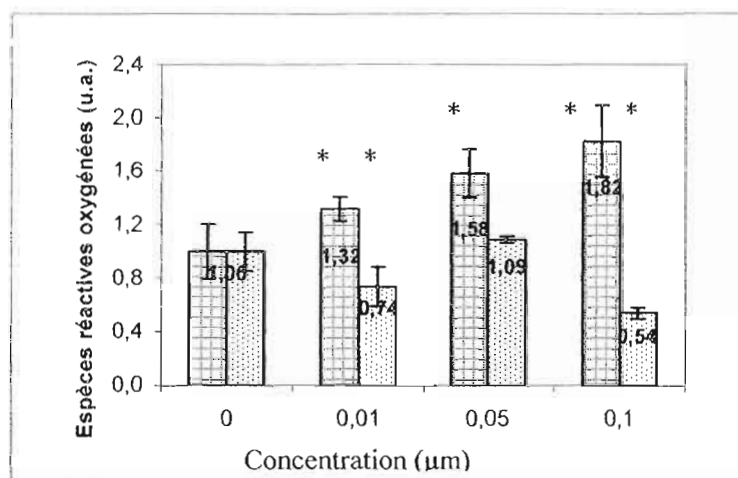
\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

Figure 6.1.3. Granulosité des cellules de *Microcystis* UTCC 299 exposée pendant 96 heures à 0, 0,01, 0,05 et 0,1 µM d'Aatrex. Les unités sont arbitraires.





#### 6.1.4. Espèces réactives oxygénées.

L'Aatrex induit une forte production de ERO chez UTCC 299 à 24 heures (Figure 6.1.4.). Un fait intéressant est la forte baisse du niveau de ERO notée à 96 heures. Le contenu en chlorophylle augmente à 24 heures et le niveau de ERO aussi. Une hausse de la quantité de chlorophylle ou de pigments liés aux phycobilisomes entraînerait une plus grande captation de l'énergie lumineuse qui, du fait du blocage du transport des électrons, serait en mesure de former des espèces réactives oxygénées (Rutherford et Krieger-Liszky, 2001). Par la suite, le niveau de chlorophylle diminue jusqu'à revenir au niveau du témoin pendant que les ERO diminuent à 96 heures. Il est curieux de constater la très forte baisse de ERO à 96 heures, niveau se trouvant plus bas que le témoin. La récupération semble totale.



\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

Figure 6.1.4. Formation d'espèces réactives oxygénées chez UTCC 299 exposé à 0, 0,01, 0,05 et 0,1 µM de Aatrex pendant 24 heures et 96 heures et mesurée au FACScan grâce à la sonde DCFH-DA (2'-7'-dichlorofluoresceine diacétate). Excitation à 488 nm et l'émission à 525 nm. La détection des espèces réactives oxygénées (ERO) se fait en FL-1. Les valeurs sont arbitraires (u.a.). 24 heures  et 96 heures .

On peut aussi déduire que le système de détoxification des espèces réactives oxygénées est très efficace. Les fonctions de la glutathion dans les cellules des cyanobactéries ne sont pas claires et les enzymes impliquées dans sa biosynthèse sont très rarement purifiées et clonées (Ashida *et al.*, 2005). Par contre, il est connu que les cyanobactéries possèdent un haut taux de glutathion

intracellulaire (2-5  $\mu\text{M}$ ), principalement sous sa forme réduite (Tel-Or *et al.*, 1985), ce qui pourrait entraîner une protection accrue contre les xénobiotiques. De plus, les cellules des cyanobactéries peuvent accumuler le glutathion par la consommation des précurseurs des acides aminés, spécialement la cystéine (Suginaka *et al.* 1998). La présence de la *glutathion réductase* a été confirmée chez l'espèce de cyanobactérie *Anabaena* (PCC 7120) (Jiang *et al.*, 1995).

#### 6.1.5. PAM

L'effet de l'atrazine est très rapide et dès 24 heures les effets sont déjà notables. Ce qu'on remarque principalement c'est la hausse du niveau  $F_s$  lorsque UTCC 299 est exposée à de l'Aatrex pendant 96 heures (Figure 6.1.5.). Cette hausse du niveau de fluorescence indique un blocage du transport des électrons et une sur-excitation du PSII. La photochimie baisse aussi comme on pourrait s'y attendre.  $\Phi'_M$  (efficacité opérationnelle) est diminuée dès 24 heures (-26%) et récupère légèrement à 96 heures (-21%) (Tableau 6.1.5.). Le paramètre  $UQF_{rel}$  qui est assez élevé indique une inaptitude du PSI à drainer les électrons le long de la chaîne de transport des électrons. On remarque une baisse du transport des électrons ( $q_{prel}$  -9 % et  $q_P$  -27 %) à 96 heures et une forte baisse de la dissipation non-photochimique ( $q_{Nrel}$  -44 % et  $q_N$  -36%). Le  $q_{prel}$  et le  $q_P$  diminuent quelque peu, ce qui indique que le blocage est relativement peu marqué tandis que les voies de dissipations non-photochimiques sont assez fortement inhibées. Le transport des électrons cause la formation d'un gradient de protons entre le lumen et le stroma des thylacoïdes. NPQ et  $q_N$  sont liés à ce gradient de protons. Si ces paramètres baissent, comme c'est le cas ici, ceci indique que le gradient est inhibé et par extension que le transport électronique le long de la chaîne de transport est entravé. La diminution des valeurs du paramètre NPQ est déjà très remarquable à 24 heures mais celles-ci ne semblent pas diminuer davantage à 96 heures. La disparité entre le degré d'inhibition du transport électronique et la baisse marquée des paramètres de dissipations non-photochimiques pourrait être le fait d'une déviation du transport des électrons vers une voie alterne, tel qu'un transport cyclique des électrons.

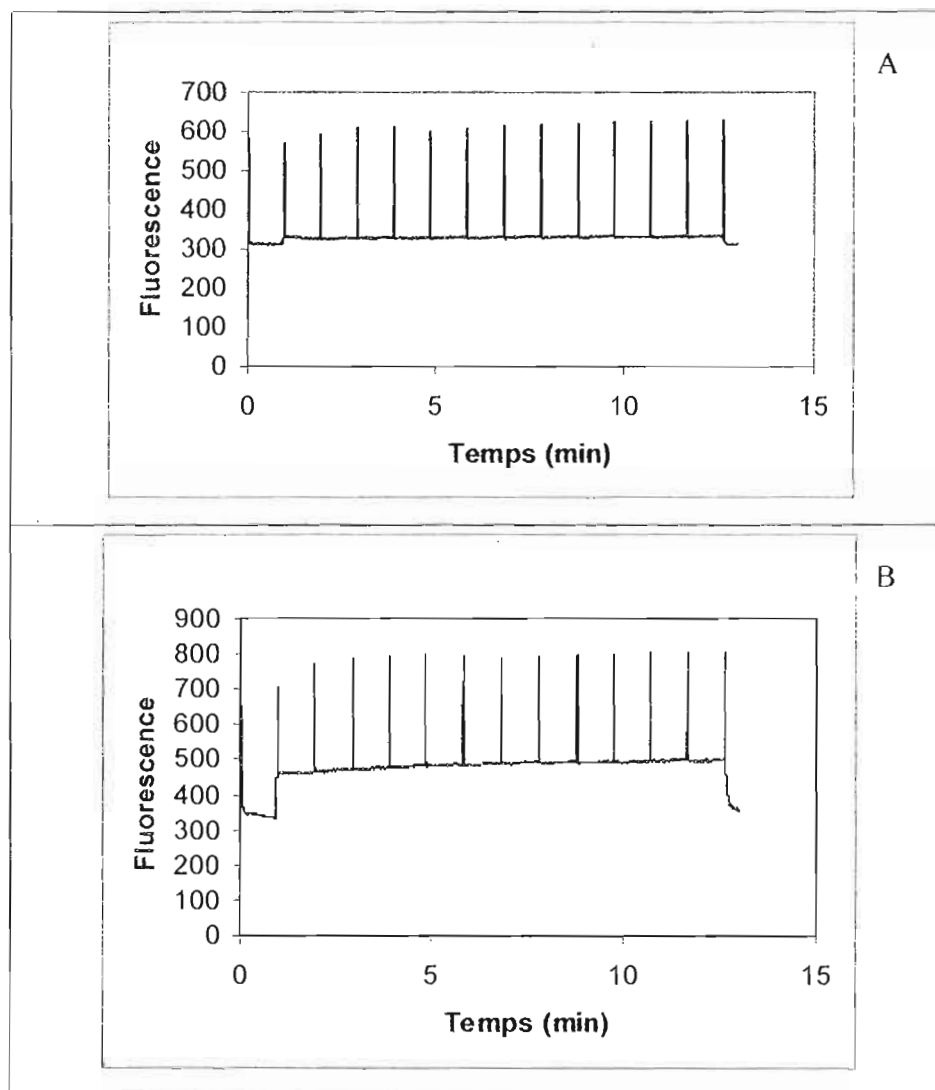


Figure 6.1.5. Cinétique de fluorescence obtenue au PAM pour UTCC 299 exposée 0 (A) et à  $0,1\mu\text{M}$  (B) de Aatrex pendant 96 heures.

#### 6.1.6. PEA.

À 96 heures, le transport des électrons dans le PSII est inhibé et est diminué de 72 % par rapport au témoin tandis que celui-ci était diminué de 53% à 24 heures, ce qui indique un blocage marqué et une moins bonne capacité de transférer les électrons dans la chaîne de transport des électrons.

Tableau 6.1.4. Effets de 0,1  $\mu\text{M}$  d'Aatrex sur les diverses voies de dissipation de l'énergie de UTCC 299 exposée pendant 24 heures et 96 heures. É-t signifie écart-type.

AATREX								
299		$\Phi'_M$	$q_{\text{Prel}}$	$q_{\text{Nrel}}$	$q_P$	$q_N$	UQFrel	NPQ
Témoin 24 h	moy	0,450	0,554	0,389	0,907	0,376	0,057	0,317
	É-t	0,008	0,020	0,020	0,015	0,012	0,009	0,026
0,1 $\mu\text{M}$ 24 h	moy	0,333*	0,500	0,233	0,643*	0,263	0,267*	0,166
	É-t	0,043	0,099	0,099	0,051	0,096	0,003	0,085
Variation vs tém 24 h		-26%	-10%	-40%	-30%	-30%	+368%	-48%
Témoin 96 h	moy	0,475	0,598	0,360	0,934	0,363	0,042	0,287
	É-t	0,005	0,015	0,017	0,001	0,018	0,002	0,017
0,1 $\mu\text{M}$ 96 h	moy	0,376*	0,547	0,203*	0,686*	0,233*	0,250*	0,141*
	É-t	0,004	0,026	0,041	0,005	0,042	0,016	0,033
Variation vs tém 96 h		-21%	-9%	-44%	-27%	-36%	+495%	-51%

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

À 24 heures, le flux d'absorption d'énergie lumineuse par les pigments des antennes (Van Heerden *et al.*, 2004), ou la taille des antennes fonctionnelle (ABS/RC), diminue (-28%) puis celui-ci récupère un peu à 96 heures (-22%) (Tableau 6.1.5.). Le PSII est un complexe pigmentprotéine inséré dans la membrane des thylacoïdes qui comporte deux parties structurellement différentes et de fonctions différentes. Une partie consiste dans le cœur du complexe contenant le centre réactionnel lié aux protéines DI et D2 et l'autre dans des complexes CP43 et CP47 qui consistent en une antenne interne. Les complexes CP43 et CP47 lient plusieurs molécules de chlorophylle *a* et de carotène. Ces complexes transfèrent l'excitation de l'antenne périphérique (qui est le phycobilisome chez les cyanobactéries) vers le centre réactionnel (de Weerd *et al.*, 2002). L'antenne externe appelée phycobilisome est mobile dans la membrane des thylacoïdes et peut se déplacer des PSII aux PSI. Les antennes transmettant l'énergie lumineuse aux centres réactionnels composés de chlorophylle, une baisse de la probabilité de captation des photons incidents par les centres réactionnels causée par une antenne externe dégradée (baisse de

ABS/RC ou baisse de la quantité de photons absorbés par centre réactionnel) ne permettra pas une aussi bonne distribution et excitation des centres réactionnels. Les centres réactionnels seront moins excités et contribueront moins à l'absorbance totale mais une hausse de la quantité de chlorophylle peut compenser cet état de fait, ce qui ferait augmenter la valeur du paramètre RC/ABS.

Comme la chlorophylle *a* ne semble pas se dégrader beaucoup (on pourrait détecter cet état de fait à travers une baisse des paramètres relatifs aux centres réactionnels actifs qui participent à l'absorbance (RC/ABS)), on peut penser que les phycobilisomes sont les structures affectées, qu'elles se dégradent et que ceci suffit à protéger les centres réactionnels des PSII du fait de la baisse de la quantité d'énergie dirigée vers le PSII. Deux paramètres se démarquent, RC/CS et RC/ABS qui voient leurs valeurs respectives augmenter de +58 % et +42 % à 24 heures tandis que, par la suite, les valeurs de ces paramètres baissent légèrement à 96 heures (+35 % et +29%). Il semble que l'excitation des centres réactionnels par section transversale (RC/CS) et contribuant à l'absorbance totale (RC/ABS) soit un peu moins marquée à 96 heures même si le blocage est encore très présent. Il est logique de penser que l'effet de verdissement présenté dans la section 6.1.2. et qui indique une hausse de la quantité de chlorophylle *a* (qui se trouve principalement au niveau des centres réactionnels, des antennes internes et du PSI) dans les cellules à 24 heures soit la cause de la hausse initiale de ces deux paramètres. En effet, une hausse de la présence des pigments collecteurs d'énergie lumineuse ou pouvant la transférer implique une plus grande probabilité de stimulation des centres réactionnels et une hausse de la quantité de centres réactionnels actifs. De plus, la probabilité de production d'espèces réactives oxygénées est haussée du fait du blocage généré par l'herbicide et de l'emprisonnement des électrons au niveau du PSII, ce qui peut causer, par la suite, la destruction de la chlorophylle et une baisse des valeurs des paramètres RC/CS et RC/ABS. L'atrazine affecte grandement la photosynthèse et cet herbicide connu pour bloquer le transport des électrons entre les quinones A et B (Jursinic et Stemler, 1983) a un effet marqué sur la souche toxique qui est passablement sensible à l'atrazine (Figure 6.1.6.). On remarque que l'atrazine peut produire des espèces réactives oxygénées dans les cellules à court terme. Selon (Rutherford et Krieger-Liszkay, 2001), l'atrazine ne produirait pas d'espèces réactives oxygénées à cause de l'impossibilité de recombinaison de charge, ce qui ne favoriserait pas la réaction de retour des électrons dans la chaîne de transport des électrons au sein du PSII et l'herbicide serait ainsi relativement protecteur contre les photo-dommages *in vitro*. Mais ils précisent toutefois que cette apparence de protection est toute relative. Dans un système intact et fonctionnel, le transfert électronique

se fait vers l'avant et l'énergie est utilisée pour le processus de la photosynthèse. Quand l'herbicide est présent, la recombinaison de charge (retour en arrière) est en fait une réaction qui peut se faire très probablement. Donc, il semblerait que la même voie  $P_{680}^{\bullet+} + Ph^{\bullet-} \rightarrow {}_3P_{680}$  même si non favorisée est possible mais cette réaction est moins marquée que dans le cas des herbicides phénoliques. Par la suite, nous avons constaté que ces espèces réactives oxygénées disparaissaient après 96 heures. Dans un même temps, le contenu en chlorophylle diminuait. L'atrazine en bloquant le transport des électrons permet la création des espèces réactives oxygénées qui détruisent les pigments photosynthétiques, ce qui peut expliquer la baisse de l'excitation des centres réactionnels notés avec les paramètres RC/CS et RC/ABS.

Dans des conditions de déficience en fer, certaines cyanobactéries produisent une protéine liant de la chlorophylle et appelée CP43' (Pakrasi *et al.*, 1985a, 1985b). Ce complexe protéine/chlorophylle est codé par le gène *isiA*. Ivanov *et al.*, (2006) détectèrent l'apparition du polypeptide liant la chlorophylle CP43' dès 24 heures dans des cellules de *Synechococcus* stressées par le manque de fer.

Parmi les nombreuses réponses des cellules de cyanobactéries aux conditions stressantes causées par une déficience en fer (Öquist, 1974c, 1974d ; Guikema et Sherman, 1983 ; Ivanov *et al.*, 2000 ; Sandström *et al.*, 2001, 2002 ; Michel et Pistorius, 2004), une de ces réponses est l'apparence d'un complexe protéine/chlorophylle appelé CP43' (Pakrasi *et al.*, 1985a, 1985b; Riethman et Sherman, 1988; Burnap *et al.*, 1993). Le CP43' possède une forte homologie à la protéine CP43 du cœur de PSII (Burnap *et al.*, 1993; Falk *et al.*, 1995). Il a été suggéré que CP43' pouvait remplacer CP43 agissant comme un complexe antennaire alternatif pour le PSII (Pakrasi *et al.*, 1985b) ou comme un dissipateur d'excitation avec la capacité de protéger le PSII des dommages créés par la photoinhibition durant le manque de fer (Park *et al.*, 1999 ; Sandström *et al.*, 2001 ; Cadoret *et al.*, 2004 ; Ihalaïnen *et al.*, 2005). L'induction de la protéine IsiA durant des conditions de fortes luminosités, et ce, même en présence de fer a confirmé sa fonction photo-protectrice (Havaux *et al.*, 2005). De plus, l'expression de *isiA* lors de stress causés par des conditions fortement salines (Hagemann *et al.*, 1999), de chaleur (Fulda et Hagemann, 1995) et de stress oxydant (Jeanjean *et al.*, 2003 ; Yousef *et al.*, 2003), pourrait être considérée comme une réponse générale aux stress. De précédentes observations indiqueraient que la fluorescence du PSII à 685 nm chez les cyanobactéries croissant dans des conditions de déficience en fer proviendrait de protéines CP43' (Burnap *et al.*, 1993; Falk *et al.*, 1995; Park *et*

*al.*, 1999). CP43' pourrait fonctionner comme dissipateur non-radiatif de l'énergie lumineuse, protégeant le PSII d'une excitation excessive dans des conditions de déficience en fer.

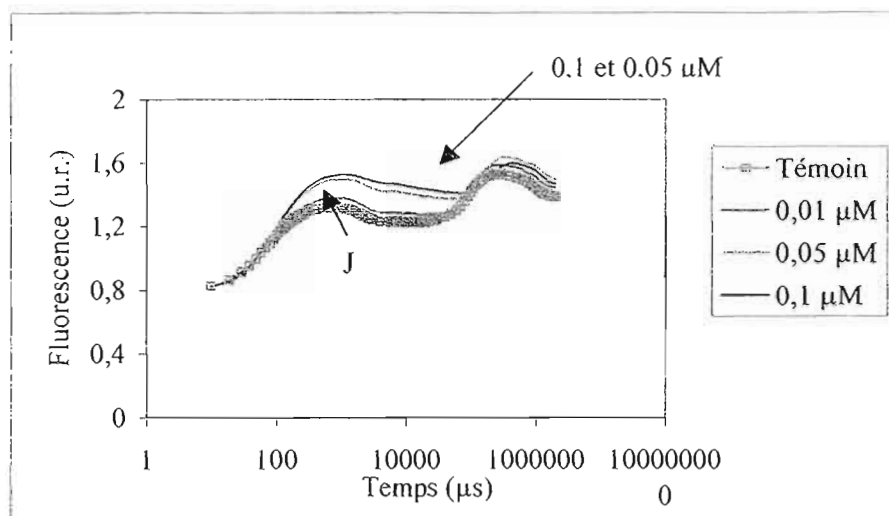


Figure 6.1.6. Courbe de cinétique rapide obtenue au PEA pour UTCC 299 exposée à 0, 0,01, 0,05 et 0,1 μM d'Aatrex pendant 96 heures. La courbe en gras est le témoin. On remarque une hausse du niveau J indiquant par ce fait un blocage entre Q<sub>A</sub> et Q<sub>B</sub>.

Nous avons constaté que la dissipation au niveau de la chlorophylle des antennes (Dio/RC) était moins efficace à 24 heures (-35%) puis remontait légèrement à 96 heures (-25%). La hausse de chlorophylle notée précédemment pourrait provenir d'une augmentation de la production de CP43' servant d'antenne interne et qui servirait d'antenne alternative pour le PSII si le complexe antennaire externe était fortement dégradé. Le blocage créé par l'herbicide persistant, une partie de cette production de chlorophylle serait détruite à son tour.

La formation de la protéine IsiA chez des cyanobactéries stressées par une déficience en fer pouvait aussi être accompagnée, dans certains cas, par la formation d'un anneau de 18 protéines CP43' autour du PSI chez *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Boekema *et al.*, 2001) et *Synechocystis* PCC 6803 (Bibby *et al.*, 2001 a, 2001b).

Tableau 6.1.5. Effets de 0,1  $\mu$ M d'Aatrex sur les paramètres biophysiques de UTCC 299 exposée pendant 24 heures et 96 heures. É-t signifie écart-type.

AATREX							
299		ABS/RC	ETo/RC	TRo/RC	Dfo/RC	RC/CS	RC/ABS
Témoin 24 h	moy	15,320	1,559	4,064	-11,256	0,089	0,065
	É-t	0,340	0,020	0,039	0,302	0,002	0,001
0,1 $\mu$ M 24 h	moy	10,973*	0,737	3,626	-7,347*	0,140	0,093*
	É-t	1,155	0,365	0,163	1,030	0,022	0,010
Variation vs tém 24 h		-28%	-53%	-11%	-35%	+58%	+42%
Témoin 96 h	moy	11,638	1,946	7,481	-7,481	0,134	0,086
	É-t	0,536	0,063	0,473	0,473	0,009	0,004
0,1 $\mu$ M 96 h	moy	9,052*	0,542*	5,577*	-5,577	0,181	0,111*
	É-t	0,505	0,038	0,436	0,436	0,015	0,006
Variation vs tém 96 h		-22%	-72%	-16%	-25%	+35%	+29%

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

#### 6.1.7. Analyse condensée.

La quantité de chlorophylle chez les échantillons traités augmente par rapport au témoin à 24 heures puis elle redescend sensiblement au même niveau du témoin à 96 heures. La chlorophylle est dégradée (et fort possiblement les phycobilisomes) lorsque UTCC 299 est exposée à de l'atrazine pendant 96 heures. La grosseur des cellules diminue un peu par rapport au témoin et ceci est particulièrement vrai au bout de 96 heures. Les plus petites cellules, de par l'augmentation du rapport volume/surface, peuvent avoir une prise en charge des toxiques (uptake) plus élevée, augmenter la captation du toxique par les cellules augmentant de cette façon la toxicité. Une surcharge de la chaîne de transport des électrons va générer une plus grande quantité de ERO et si les fonctions qui doivent protéger contre ces espèces réactives sont inefficaces, un stress oxydant va être créé (Foyer *et al.*, 1994 a,b; Anderson *et al.*, 1997; Dağ *et*



*al.*, 2000). Quand la chaîne de transport des électrons est surchargée, les électrons en excès peuvent être déviés des transporteurs de la plastoquinone à l' $O_2$  amenant ainsi la formation du radical libre  $O_2^{\bullet-}$ . Il semblerait qu'un mécanisme de protection contre les effets nocifs des espèces réactives oxygénées se mette en branle car on observe une forte baisse de ceux-ci à 96 heures. La baisse de la quantité de chlorophylle ne peut seule expliquer cet état de fait.

Des voies de déviations pour les électrons lors de situations de stress aggravés par une luminosité excessive sont de toute première importance. Il y a en plus du transport linéaire des électrons de l'eau au NADP<sup>+</sup> et servant à l'incorporation du  $CO_2$  d'autres voies alternes du transport électronique: la réaction de Mehler (Mehler, 1957), le transport cyclique au niveau du PSI (Heber *et al.*, 1978), le transport cyclique au sein même du PSII (Miyake et Yokota 2001). La réaction de Mehler représente la photoréduction de  $O_2$  au niveau du PSI. Le cycle de Mehler a une fonction dans le départ du processus de photosynthèse et amène rapidement la formation d'un gradient de proton à travers la membrane thylacoïdale juste après l'illumination. Cette réponse ne sert pas seulement à la protection du PSII juste après une soudaine illumination mais sert aussi à l'activation des enzymes impliquées dans le cycle de Calvin (Makino *et al.*, 2002). Dans des chloroplastes intacts, le cycle de Mehler est un mécanisme éboueur des ERO et de dissipation sous forme de chaleur de l'énergie lumineuse en excès (Asada, 1999).

La réduction de  $O_2$  et la formation de  $O_2^{\bullet-}$  lors de la réaction de Mehler qui se produit au niveau du PSI peut être une alternative utile pour la prise en charge des électrons excédentaires qui surchargent la chaîne de transport des électrons lors d'une situation de luminosité excessive. Si  $O_2^{\bullet-}$  est scindé efficacement en  $H_2O_2$  et  $O_2$  grâce à la *superoxyde dismutase* et si le cycle acide ascorbique/glutathion prend en charge  $H_2O_2$  de façon efficace, les ERO ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ) peuvent être détoxiquées en eau et  $O_2$  (Edreva, 2005). Pour que la réaction de Mehler soit efficace et protège bien, il doit y avoir équilibre entre la fonction éboueur et la production de ERO.

La réaction de Mehler génère un gradient de pH à travers la membrane des thylacoïdes quand peu d'accepteurs d'électrons sont disponibles au niveau du PSI. Ce gradient de proton augmente la dissipation non-radiative de l'énergie lumineuse nommée *quenching* non-photochimique (NPQ). Donc le cycle de Mehler est considéré comme un mécanisme de dissipation de l'excès d'énergie lumineuse (Asada, 1999; Foyer et Noctor, 2000; Osmond *et al.*, 1997; Osmond et Grace, 1995). Ce cycle n'agit pas sur le maintien d'un haut NPQ et ne régule pas l'efficacité photochimique du PSII. Cette régulation se fait par le transport cyclique au niveau du PSI. Ce dernier transport ne produit pas d'espèces réactives oxygénées et certains considèrent le

transport cyclique au niveau du PSI comme plus important que le cycle de Mehler (Cornic *et al.*, 2000; Clarke et Johnson, 2001).

Le transport cyclique au niveau du PSI produit de l'ATP sans réduction de NADP<sup>+</sup>. Endo *et al.*, (1999), rapportèrent que le transport cyclique jouait un rôle dans la protection du PSII contre la photo-inhibition grâce au gradient de protons à travers la membrane des thylacoïdes qui est représenté par le paramètre NPQ. Des conclusions similaires ont été tirées dans une étude faite sur des fèves dans des conditions de basse concentration de CO<sub>2</sub> (Cornic *et al.*, 2000) et avec de l'orge et des concombres dans des conditions de froid (Clarke et Johnson 2001, Kim *et al.*, 2001).

Comme nous avons constaté que la croissance ne diminue pas, c'est qu'un système continue à produire de l'ATP et permet à l'organisme de survivre malgré le blocage du transport des électrons. Un transfert antennaire du PSII vers le PSI et la prise en charge des électrons excédentaires par la réaction de Mehler ou le transport cyclique des électrons au niveau du PSI est une hypothèse envisageable.

## 6.2. DUAL MAGNUM ET DUAL II MAGNUM.

### 6.2.1. Croissance et volume cellulaire.

On ne voit aucun effet sur la croissance (Tableau 6.2.1.) avec le Dual magnum (métolachlore sans le phytoprotecteur Benoxacor) ni avec le Dual II magnum (métolachlore avec le phytoprotecteur Benoxacor). De plus, il n'y avait pas d'effets notés sur le volume cellulaire (données non montrées).

Tableau 6.2.1. Croissance de UTCC 299 selon le compte cellulaire exposée à 0, 0,05 et 0,1  $\mu\text{M}$  Dual magnum et Dual II magnum pendant 4 jours. Les unités représentent le nombre de fois une population est doublée par jour (dble d<sup>-1</sup>).

Jours	Herbicide	0 $\mu\text{M}$	0,05 $\mu\text{M}$	0,10 $\mu\text{M}$
4	Dual magnum	0,389 $\pm$ 0,008	0,402 $\pm$ 0,013	0,392 $\pm$ 0,013
4	Dual II magnum	0,389 $\pm$ 0,008	0,405 $\pm$ 0,009	0,400 $\pm$ 0,010

### 6.2.2. PAM

On ne remarque pas d'effets du Dual magnum sur les paramètres photosynthétiques de UTCC 299 à 96 heures.

On voit une très légère hausse (Tableau 6.2.2.) de la photochimie ( $q_{\text{Prel}}$  +5%) et une baisse de NPQ (-9%) à 96 heures lorsque UTCC 299 a été exposée au Dual II magnum. La valeur de  $\text{UQF}_{\text{rel}}$  monte aussi légèrement mais l'ampleur de la hausse (+8%) est négligeable. On peut seulement parler d'une légère tendance.

### 6.2.3. PEA.

Les paramètres extraits de la cinétique rapide montrent une légère hausse de la photochimie (+11 %) (Tableau 6.2.3.) lors de l'exposition au Dual magnum. Mais on ne peut en déduire que l'effet du Dual magnum favorise réellement le transport des électrons car les écarts-types sont assez larges.

Tableau 6.2.2. Effets de 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Dual magnum (sans Benoxacor) et de Dual II magnum (avec Benoxacor) sur les diverses voies de dissipation de l'énergie de UTCC 299 exposée pendant 96 heures. La concentration de Benoxacor dans le Dual II magnum est de 4% (p/p). É-t signifie écart-type.

DUAL MAGNUM								
299		$\Phi'_M$	$q_{Prel}$	$q_{Nrel}$	$q_P$	$q_N$	UQFrel	NPQ
Témoin 96 h	moy	0,436	0,528	0,424	0,917	0,423	0,048	0,350
	É-t	0,004	0,006	0,008	0,002	0,008	0,002	0,007
0,1 $\mu\text{M}$	moy	0,429	0,527	0,427	0,919	0,428	0,046	0,351
	É-t	0,017	0,037	0,037	0,004	0,037	0,001	0,042
Variation vs tém	%	-2	0	0	0	+1	-4	0
DUAL II MAGNUM								
Témoin 96 h	moy	0,436	0,528	0,424	0,917	0,423	0,048	0,350
	É-t	0,004	0,006	0,008	0,002	0,008	0,002	0,007
0,1 $\mu\text{M}$	moy	0,446	0,554	0,393	0,914	0,394	0,052	0,317
	É-t	0,010	0,021	0,022	0,003	0,022	0,001	0,023
Variation vs tém	%	+2	+5	-7	0	-7	+8	-9

Pour le Dual II magnum, on ne note pas d'effets de l'herbicide sur les paramètres photosynthétiques de UTCC 299.

Tableau 6.2.3. Effets de 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Dual magnum (sans Benoxacor) et de Dual II magnum (avec Benoxacor) sur les paramètres biophysiques de UTCC 299 exposée pendant 96 heures. La concentration de Benoxacor dans le Dual II magnum est de 4% (p/p). É-t signifie écart-type.

DUAL MAGNUM							
299		ABS/RC	ETo/RC	TRo/RC	DIo/RC	RC/CS	RC/ABS
Témoin 96 h	moy	10,965	1,471	3,806	-7,159	0,141	0,092
	É-t	0,592	0,095	0,065	0,553	0,011	0,005
0,1 $\mu\text{M}$	moy	10,967	1,631	3,904	-7,063	0,142	0,091
	É-t	0,447	0,044	0,031	0,417	0,008	0,004
Variation vs tém	%	0	+11	+3	-1	0	0
DUAL II MAGNUM							
Témoin 96 h	moy	10,965	1,471	3,806	-7,159	0,141	0,092
	É-t	0,592	0,095	0,065	0,553	0,011	0,005
0,1 $\mu\text{M}$	moy	10,597	1,529	3,793	-6,805	0,147	0,094
	É-t	0,087	0,013	0,028	0,090	0,002	0,001
Variation vs tém	%	-3	+4	0	-5	+4	+2

### 6.3. PRIMEXTRA II MAGNUM

#### 6.3.1. Croissance.

Au bout de 96 heures, on remarque une légère baisse de la croissance cellulaire à partir de la concentration de 0,05  $\mu\text{M}$  (Tableau 6.3.1.).

Tableau 6.3.1. Taux de croissance selon le compte cellulaire, après 96 heures, de UTCC 299 exposée à 0, 0,01, 0,05 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra II magnum. Les mesures ont été faites au Coulter Counter. Les unités représentent le nombre de fois une population est doublée par jour (dble.d<sup>-1</sup>).

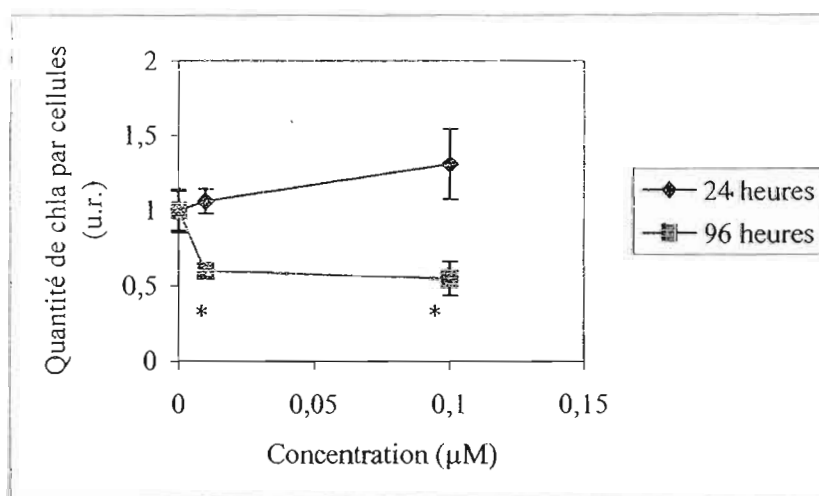
Jours	0 $\mu\text{M}$	0,010 $\mu\text{M}$	0,050 $\mu\text{M}$	0,10 $\mu\text{M}$
4	0,374 $\pm$ 0,016	0,376 $\pm$ 0,019	0,357 $\pm$ 0,009	0,326 $\pm$ 0,018 *

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

#### 6.3.2. Contenu en chlorophylle.

On note une hausse de la quantité de chlorophylle par cellule à 24 heures (+31%) suivie d'une baisse du contenu en chlorophylle à 96 heures (-45 %) après exposition à 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra II magnum (Figure 6.3.1. et Annexe A.3.). La tendance est exactement la même pour le contenu en chlorophylle par volume cellulaire (Tableau 6.3.2.). On remarque une hausse concentration-dépendante du contenu en chlorophylle par volume cellulaire à 24 heures. Par la suite, lors de l'exposition à 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra II magnum pendant 96 heures, on observe une baisse de 59% de la quantité de chlorophylle *a* par volume cellulaire. Cet effet était aussi noté dans le cas des cellules exposées à l'Aatrex mais l'ampleur de la dégradation de la chlorophylle *a* à 96 heures est beaucoup plus marquée avec le Primextra II magnum. Il semble qu'après 24 heures, il y ait ce qu'on appelle un effet de verdissement (greening effect) chez UTCC 299 lorsqu'on expose celle-ci au Primextra II magnum. Ce phénomène a déjà été constaté dans d'autres études sur les effets des triazines (Lürling et Roessink, 2006; Tang *et al.*, 1997; Gonzalez-Barreiro *et al.*, 2004). On peut penser qu'un ralentissement de la photosynthèse se produit à cause du blocage des électrons qui ne peuvent atteindre la chaîne de transport des électrons, ce qui entraîne une réaction de compensation, voire une production de chlorophylle accrue afin de

pallier à cette baisse de la photochimie. Pour ce faire, il faut une production d'ATP non entravée qui permet de continuer les processus physiologiques du cycle de Calvin. Un transport cyclique au niveau du PSI efficace pourrait être envisagé. Par contre, après 96 heures, les cellules rapetissant mais la quantité de chlorophylle par cellule diminuant aussi, l'effet de verdissement observé à 24 heures n'a plus lieu. On peut même ajouter que les résultats de la quantité de chlorophylle, lorsque ramenés au volume suit la même tendance que la quantité de chlorophylle *a* par cellule. L'étude de Gonzalez-Barreiro *et al.* (2004) rapporte exactement la même tendance avec la cyanobactérie *Synechococcus elongatus* exposée à de l'atrazine. Leur étude montre qu'il y a une hausse du niveau de la chlorophylle *a* et des caroténoïdes dans les cellules après 48 heures d'exposition, puis une baisse du contenu en pigments survenant à 96 heures. De plus, on remarque aussi au cours de l'étude de Gonzalez-Barreiro *et al.* (2004), une baisse des niveaux de pigments liés aux phycobilisomes, soit la phycocyanine et l'allophycocyanine. Au bout d'un certain temps, le processus compensatoire du transport cyclique des électrons au niveau du PSI pourrait ne plus suffire à la demande et être moins en mesure de pallier aux dégâts causés par l'herbicide.



\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

Figure 6.3.1. Quantité de chlorophylle *a* par cellules chez UTCC 299 exposée à 0, 0,01 et 0,1 µM de Primextra II magnum pendant 24 et 96 heures.

Tableau 6.3.2. Quantité de chlorophylle *a* par volume cellulaire chez UTCC 299 exposée à 0, 0,01 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra II magnum pendant 24 et 96 heures.

299 Primextra II magnum		24 h	96 h
0 $\mu\text{M}$	$\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\mu\text{m}^3$	0,00129	0,00590
	Écart-type	0,00019	0,00077
0,01 $\mu\text{M}$	$\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\mu\text{m}^3$	0,00136	0,00392 *
	Écart-type	0,00011	0,00031
0,1 $\mu\text{M}$	$\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\mu\text{m}^3$	0,00151	0,00350 *
	Écart-type	0,00030	0,00084

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

On remarque qu'il y a plus de chlorophylle *a* à 96 heures qu'à 24 heures lorsque l'on compare les témoins entre eux. De plus, les échantillons traités à 24 heures présentent un contenu en chlorophylle plus élevé que celui du témoin. Cette hausse sera discutée ultérieurement.

### 6.3.3. Volume cellulaire et granulosité.

Le volume cellulaire diminue à 24 heures mais d'une façon marginale. Par contre, le volume diminue drastiquement à 96 heures lorsque l'on expose UTCC 299 à 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra II magnum (-25 %) (Tableau 6.3.3 et Annexe B.3.). La baisse de volume est plus marquée que dans le cas de l'Aatrex. L'étude de Senjie *et al.* (2001) nous démontre que le stress causé par un manque en fer amène une réduction du volume cellulaire d'une algue unicellulaire flagellée de l'ordre des Volvales, *Dunaliella tertiolacta*. Une baisse du volume cellulaire dans des conditions de restriction en fer a déjà été constatée dans les études de Hudson et Morel (1990) et Sunda et Huntsmann (1995) chez du phytoplancton côtier et océanique. Le contrôle induit par les variations de taille des cellules sur le cycle cellulaire, contrôle par lequel les cellules ne commenceront pas à synthétiser de l'ADN et à entrer en mitose jusqu'à ce qu'une taille seuil soit atteinte, a déjà été considéré comme un important mécanisme de régulation du cycle cellulaire chez le phytoplancton (Donnan et Johns, 1983; Homma et Hastings, 1989). La baisse de la croissance cellulaire peut provenir d'un allongement du temps de génération (doublage) des cellules (Senjie *et al.*, 2001). Des études ont montré qu'une déficience en nitrate et en phosphate allongeait les stades G1 et G2 du cycle cellulaire.



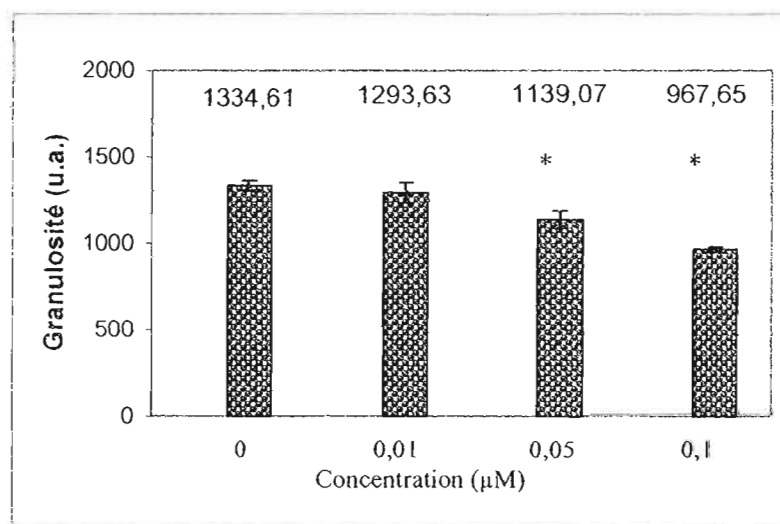
Tableau 6.3.3. Volume cellulaire de UTCC 299 exposée à 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra II magnum pendant 24 heures et 96 heures. Les unités sont en valeurs relatives.

Traitement	Volume (u.r.)	
	24 heures	96 heures
Témoins	1	1
Écart-type	$\pm 0,003$	$\pm 0,022$
0,1 $\mu\text{M}$	0,916*	0,746*
Écart-type	$\pm 0,011$	$\pm 0,024$

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

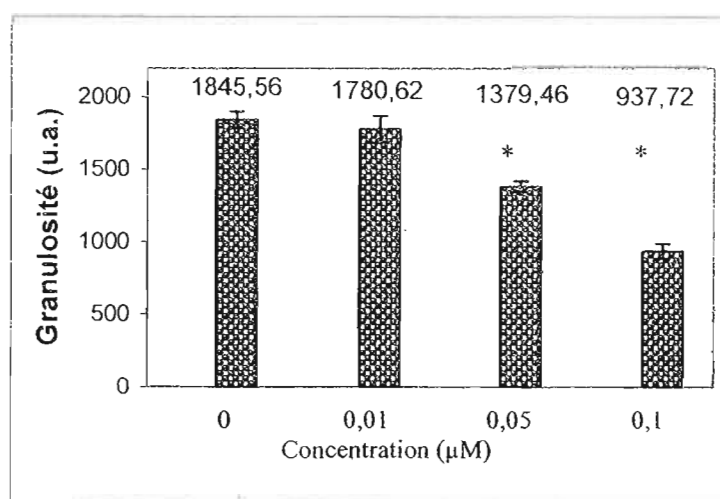
Les variations dans la taille des cellules sont toutes significativement différentes selon le test de Student ( $P < 0,05$ ) quelles que soient les concentrations testées, et ce, pour 24 heures et 96 heures.

On remarque une hausse de la granulosité des témoins à 96 heures lorsque l'on compare avec ceux de 24 heures (Figure 6.3.2. et 6.3.3.). Cette hausse de la granulosité peut être due à l'augmentation de la quantité de chlorophylle dans les cellules (Annexe A.1.). Une hausse de la quantité de chlorophylle dans les cellules après un certain temps de croissance a déjà été constatée (El-Dib *et al.*, 1990). Cette hausse peut être aussi due à une augmentation de la quantité de pigments composant les phycobilisomes. La baisse subséquente de la granulosité peut provenir de la dégradation ou d'une certaine inhibition de la synthèse de la chlorophylle ou des phycobiliprotéines. Gonzalez-Barreiro *et al.*, (2004) remarquèrent que les cellules exposées à de l'atrazine et devenues chlorotiques, en voie de dégradation de leurs pigments, présentaient une granulosité supérieure à celle des cellules pigmentées et témoins pendant les premières 48 heures. Après 48 heures, cette granulosité interne diminuait chez les cellules chlorotiques et était plus faible que celle des cellules pigmentées. Le processus de la chlorose est une réponse aux stress environnementaux, tel que le manque de nutriments (Collier et Grossman, 1992). C'est un état temporaire qui peut être renversé lorsque les conditions environnementales redeviennent clémentes. Les herbicides, tels que les triazines qui affectent le processus de la photosynthèse, pourraient induire un état chlorotique dans les cellules algales.



\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

Figure 6.3.2. Granulosité des cellules de *Microcystis* UTCC 299 exposée pendant 24 heures à 0, 0,01, 0,05 et 0,1 µM de Primextra II magnum. La granulosité est en valeurs arbitraires.



\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

Figure 6.3.3. Granulosité des cellules de *Microcystis* UTCC 299 exposée pendant 96 heures à 0, 0,01, 0,05 et 0,1 µM de Primextra II magnum. La granulosité est en valeurs arbitraires.

L'évolution de la chlorose chez *Synechococcus* PCC 7942 affectée par un stress induit par un manque de nutriments présentait trois étapes : la première provenait de la dégradation des

phycobilisomes, la deuxième de la perte graduelle de la chlorophylle *a* et des protéines et finalement la perte totale de tous pigments amenant un état de latence chez les cellules (Sauer *et al.*, 2001). Gonzalez-Barreiro *et al.*, (2004) ont constaté la présence des deux premiers états mais pas l'entrée en dormance des cellules.

On peut voir un lien entre la granulosité et la taille des antennes (Figure 6.3.4.). La régression linéaire de la granulosité en fonction de la taille des antennes ( $R^2=0,67$ ) montre bien que si la taille des antennes diminue la granulosité des cellules est aussi à la baisse. La relation est la même à 24 heures avec un  $R^2=0,76$ . Nous avons constaté une baisse de la granulosité marquée chez les cellules traitées à 96 heures et on peut à la lumière de tous les résultats en déduire que la taille des antennes est véritablement affectée à la baisse.

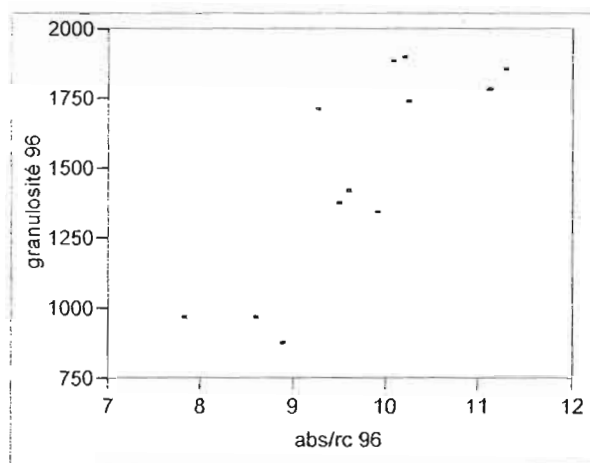


Figure 6.3.4. Granulosité des cellules de UTCC 299 exposée au Primextra II magnum en fonction de taille des antennes à 96 heures.  $R^2=0,67$ .

On note aussi qu'il y a un lien entre la concentration totale en chlorophylle *a* et la granulosité (Figure 6.3.5.). Une baisse de la concentration totale en chlorophylle *a* est liée avec une baisse de la granulosité. On peut en conclure que les traitements au Primextra II magnum amènent une baisse de la taille antennaire chez *Microcystis aeruginosa* 299 à 96 heures.

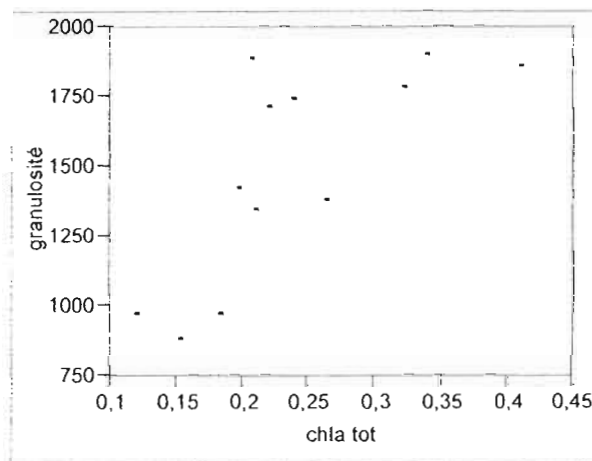


Figure 6.3.5. Granulosité des cellules de UTCC 299 exposée au Primextra II magnum en fonction de la chlorophylle *a* totale à 96 heures.  $R^2=0,56$ .

Certaines études démontrent qu'il peut y avoir une hausse du contenu cellulaire en chlorophylle et en phycobilisomes lors de certains stress. Miller et Holt, (1977) constatèrent que lorsque *Synechococcus* était privée de  $CO_2$ , il y avait une légère augmentation de la chlorophylle *a* et de la C-phycocyanine pendant les 72 premières heures. Puis, une diminution de ces pigments était remarquée après 96 heures. De même, Vasileva et Levitin, (1974) lors de traitements semblables avec *Anacystis nidulans*, remarquèrent que, durant les 3 premiers jours, les cellules conservaient une quantité de chlorophylle *a* constante mais qu'il y avait une hausse de la C-phycocyanine. Zhou *et al.*, (2006) démontrèrent au cours de leur étude que l'exposition de la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa* Kütz 854 à des concentrations élevées de cadmium affectait de façon significative le contenu cellulaire en phycocyanine (PC) et en allophycocyanine (APC). Les cellules traitées montraient une baisse marquée du contenu de ces pigments. Une baisse des ratios APC/Chl*a* et PC/Chl*a* fut aussi observée. Cette baisse provenait principalement de celle des pigments phycocyanine et allophycocyanine même si la quantité de chlorophylle *a* diminuait aussi mais de façon beaucoup moins marquée. Donc, les APC et PC semblent être les pigments atteints le plus tôt et le plus fortement dans les processus de dégradation des pigments photosynthétiques. Ceci pourrait résulter dans une baisse du taux de captation de l'énergie par les centres réactionnels des PSII et permettre la distribution de l'énergie d'excitation en faveur du PSI (Jeanjean *et al.*, 1993; Hibino *et al.*, 1996). Selon Zhou *et al.*, (2006), la baisse de phycobiliprotéines observées serait un mécanisme d'adaptation de

*Microcystis aeruginosa* à des conditions élevées de cadmium dans le milieu. La dégradation du phycobilisome serait une réponse adaptative générale aux différentes conditions de stress (Sendersky *et al.*, 2005).

On remarque à 96 heures une forte baisse de la granulosité des cellules traitées par rapport au témoin (figure 6.3.3.). Il semble qu'il y ait une dégradation des structures qui diffractent la lumière. Il peut y avoir une certaine dégradation de la chlorophylle mais d'autres structures peuvent aussi être en cause. Dans les cyanobactéries, il y a des antennes collectrices de lumières volumineuses appelées phycobilisomes et qui sont formées de plusieurs sous-unités. Ces complexes possèdent, en plus d'un volume conséquent, des assemblages de sous-unités (figure 3.7.) qui pourraient diffracter la lumière et être responsables d'une forte granulosité. Une dégradation ou une moins grande quantité de ces volumineux complexes peut amener une diminution de la granulosité. En effet, les sous-unités dégradées, peuvent devenir des monomères, des particules devenues très petites et qui n'auraient qu'un effet négligeable sur la granulosité. Six *et al.*, (2007) ont soumis la cyanobactérie marine *Synechococcus* à un stress causé par les UV et suggérèrent que l'altération du phycobilisome proviendrait de bris de certains «linkers» ce qui entamerait la stabilité du complexe et pourrait le démanteler. Un milieu déficient en azote a le même effet (Grossman *et al.*, 1993). Il est possible que les points de liaisons entre les différentes composantes du complexe soient les points les plus vulnérables lors de stress sévères.

Les résultats présentés par Gonzalez-Barreiro *et al.*, (2004) montrent qu'il y a diminution des phycobiline, phycocyanines et allophycocyanines chez *Synechococcus elongatus* exposée à de l'atrazine pendant 96 heures. On peut penser que, dans notre cas, les pigments composant les phycobilisomes soient affectés de la même façon à cause de la présence de l'atrazine. De plus, des granules d'un des chromophores appelé cyanophycine peuvent être présents dans le cytoplasme des cyanobactéries (Miller et Holt, 1977) et on pourrait penser à une désagrégation de ces granules fort réfringents, ce qui diminuerait d'autant plus la granulosité.

Collier *et al.*, (1994) montrèrent que l'appareil photosynthétique de cyanobactéries (*Synechococcus*) privées de nutriments (azote, phosphore ou soufre) était grandement affecté. Les phycobilisomes étaient rapidement dégradés et à 48 heures, la dégradation était complète. Un manque d'azote (Allen et Smith, 1969) amena une baisse du contenu de C-phycocyanine chez *Anabaena cylindrica* et *Anacystis nidulans*. Surosz et Palinska (2004) étudièrent les effets

du cuivre sur les cellules de la cyanobactérie *Anabaena flos-aquae* et mirent en évidence la perte des granules de C-phycoyanine. Fay et Vasconcelos (1974) démontrèrent que le manque de molybdène, un micro-nutriment impliqué dans des systèmes servant à l'assimilation de l'azote inorganique, dans le milieu de culture, amène une absence de granules de cyanophycine, une accumulation de lipides et de la vésiculation thylakoïdale. Lors d'un stress causé par le manque de dioxyde de carbone et qui amène un phénomène appelé «bleaching», on remarque après 96 heures qu'il y a disparition de chlorophylle *a* et de C-phycoyanine. Parallèlement, il y a perte de corps d'inclusion cellulaires (Miller et Holt, 1977). Les granules de cyanophycine de *Synechococcus*, par exemple, étaient perdus très tôt dans le processus de dégradation, résultat qui pourrait être attribué à leur rôle possible de source d'azote et de carbone à cause de leur composition de copolymères d'acide aspartique et d'arginine (Lang *et al.*, 1972). Certaines études considèrent que la C-phycoyanine pourrait servir, en sus de son rôle de pigment accessoire photosynthétique, de réserve d'azote rapidement accessible (Allen et Smith, 1969; Van Gorkom et Donze, 1971; Simon, 1974). Boussiba et Richmond (1980), démontrèrent la possibilité que la C-phycoyanine serve comme source d'azote chez *Spirulina platensis* lors d'une déficience en azote. L'idée est supportée par les points suivants: dans des conditions de croissance favorables, la C-phycoyanine se retrouve en très grande quantité dans les cellules algales; lorsque l'apport en azote est bas, environ 30-50% de la C-phycoyanine disparaît sans qu'il y ait effet délétère sur la croissance; la croissance des algues se trouvant dans un milieu pauvre en azote continue d'une façon normale pendant un certain temps qui dépend de la quantité initiale de C-phycoyanine dans les cellules; la C-phycoyanine est le seul composé azoté affecté à la baisse durant cette période de croissance encore normale; lorsque la synthèse de protéines est inhibée à cause du manque de nutriments ou de la méthionine sulfoximine, le contenu en C-phycoyanine diminue et la croissance commence à être affectée lorsque le contenu en C-phycoyanine diminue en bas de 50%.

#### 6.3.4. Profil pigmentaire

Les longueurs d'ondes relatives à la phycoérythrine et à la phycocyanine sont respectivement d'environ 560 nm et de 620-630 nm (Otsuka *et al.*, 1998). Il est peu facile de distinguer le pic de phycoérythrine mais le pic de 620 nm est normalement pris en considération pour vérifier la

présence des phycobiliprotéines. L'absorbance à 620 nm peut être utilisée pour estimer les changements du contenu en phycobilisomes d'une culture car virtuellement tout le contenu cellulaire en phycobiliprotéines est assemblé en phycobilisomes (Collier et Grossman, 1992).

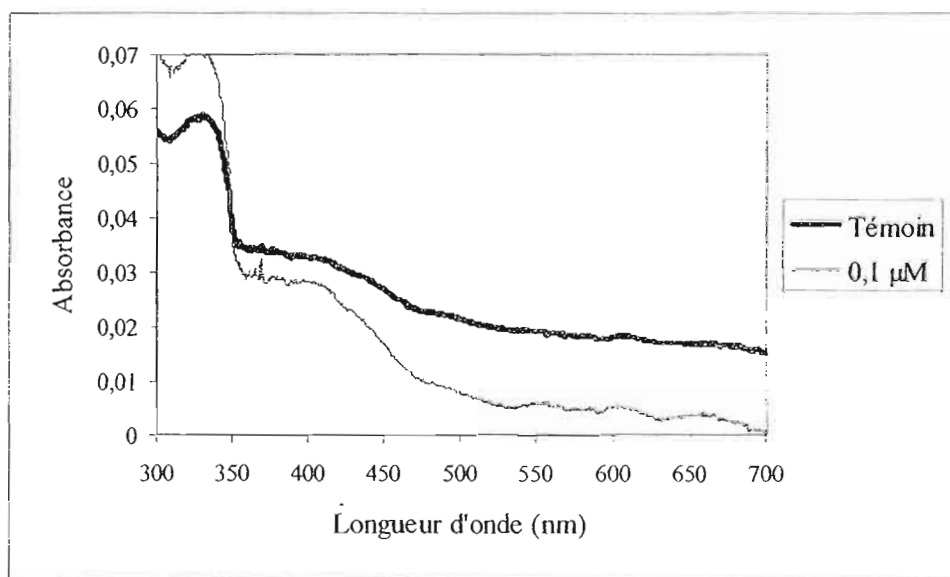


Figure 6.3.6. Profil d'absorbance des pigments de UTCC 299 pour le témoin et l'échantillon testé avec 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra II magnum après 96 heures. Le trait en gras est le témoin.

On remarque une baisse de tous les pigments lors de l'exposition de UTCC 299 à 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra II magnum après 96 heures (Figure 6.3.6.). On ne note pas un pic marqué au niveau de 620 nm, soit la longueur d'onde des phycobiliprotéines. Les signaux sont très faibles, par contre, car les échantillons proviennent de cellules filtrées à partir de volumes limités. Néanmoins, on peut toutefois remarquer une tendance claire des effets de l'herbicide sur les pigments de UTCC 299, soit une baisse des phycobiliprotéines.

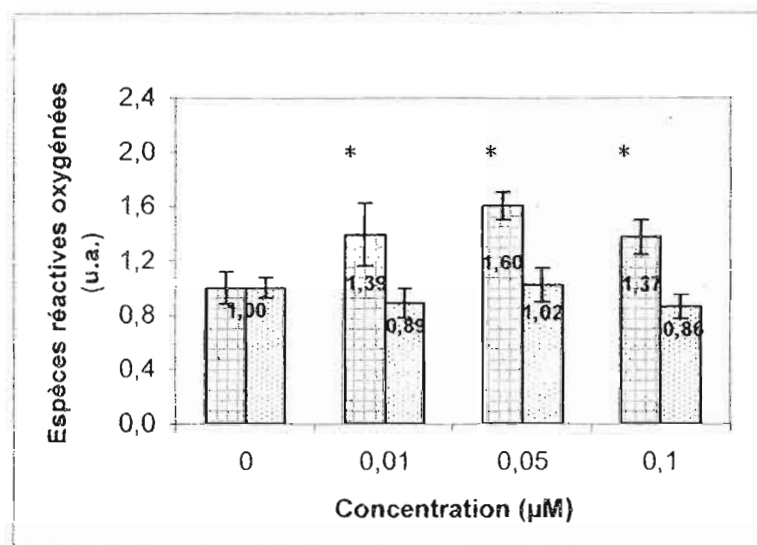
Les quantités de cellules témoins et traitées filtrées sur chacun des filtres sont sensiblement les mêmes afin de faciliter la comparaison entre l'état des pigments des témoins et celui des échantillons traités.

### 6.3.5. Espèces réactives oxygénées.



Le Primextra induit une forte production de ERO chez UTCC 299 à 24 heures (Figure 6.3.7.). Un fait intéressant est la baisse du niveau de ERO notée à 96 heures. Ici aussi, la tendance suit celle de la présence de la chlorophylle dans les cellules. Le contenu en chlorophylle baisse beaucoup dans les cellules à 96 heures et le niveau de ERO aussi. On peut penser qu'il y a un lien direct entre le niveau de ERO et la chlorophylle.

L'adjonction de l'énergie lumineuse à l'oxygène amène la production d'oxygène singulet hautement réactif près des centres réactionnels, ce qui affecte négativement les complexes pigment-protéine (Foyer *et al.*, 1994b; Slooten *et al.*, 1998; Niyogi, 1999). Lors de l'ajout des herbicides une réaction de retour des électrons vers l'arrière forme  $P_{680}^{\bullet+} + Ph^{\bullet-}$ , un état qui subit par la suite une recombinaison de charge qui amène la formation de l'oxygène singulet à travers la molécule de chlorophylle triplet dans les centres réactionnels des PSII. L'oxygène singulet formé dans les centres réactionnels endommagent les protéines liées à la chlorophylle. Ceci résulte dans le détachement de la chlorophylle de leur système de transfert énergétique et de leur pigments protecteurs associés (caroténoïdes). Ces chlorophylles détachées vont être à leur tour impliquées dans la formation de plus d'oxygène singulet (Rutherford et Krieger-Liszkay, 2001). Un blocage du transport des électrons le long de la chaîne de transport peut induire une hausse des espèces réactives oxygénées, qui plus est, si le niveau de chlorophylle augmente. Une hausse du contenu en chlorophylle implique une plus grande captation de l'énergie lumineuse et un risque accru de formation de ERO. Ces même ERO peuvent, en revanche, dégrader la chlorophylle et même fort possiblement les phycobilisomes, ce qui expliquerait la baisse du contenu en chlorophylle remarquée à 96 heures.





\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

Figure 6.3.7. Formation d'espèces réactives oxygénées chez UTCC 299 exposée à 0, 0,01, 0,05 et 0,1 µM de Primextra II magnum pendant 24 heures et 96 heures et mesurée au FACScan grâce à la sonde DCFH-DA (2'-7'-dichlorofluoresceine diacétate). Excitation à 488 nm et émission à 525 nm. La détection des ERO se fait en FL-1. Les valeurs sont arbitraires. 24 heures  et 96 heures .

À 24 heures, les différences entre les niveaux de EROs sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ) et ceci confirme que le Primextra II magnum peut induire la formation d'espèces réactives oxygénées chez UTCC 299.

Après correction pour valeurs aberrantes (2 valeurs), nous obtenons un  $R^2$  de 0,62 lors de la régression linéaire représentant la formation des EROs formées à 24 heures en fonction de la concentration en chlorophylle  $a$  par volume. On remarque bien le fort lien à 24 heures entre la quantité de chlorophylle dans les cellules et les ERO qui se forment (Figure 6.3.8.). Ceci confirme le fait qu'une plus grande quantité de chlorophylle peut permettre la création d'espèces réactives oxygénées lors de la présence d'un blocage créé par un herbicide tel que le Primextra II magnum.

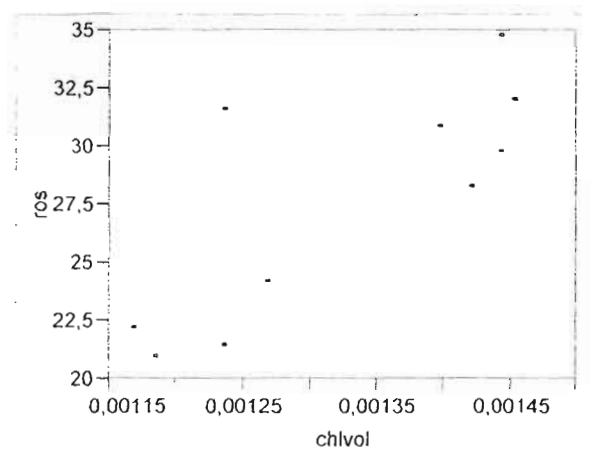


Figure 6.3.8. Relation entre la chlorophylle par volume et les ERO formées à 24 heures chez UTCC 299 exposée au Primextra II magnum. On obtient un  $R^2$  de 0,62. Deux valeurs ont été retirées.

#### 6.3.6. PAM.

Ce qu'on remarque principalement lors des tests faits au PAM, c'est la hausse du niveau  $F_s$  lorsque UTCC 299 est exposé au Primextra II magnum pendant 96 heures (Figure 6.3.9.). Cette hausse du niveau de fluorescence indique un fort blocage du transport des électrons et une sur-excitation du PSII (Frankart, *et al.*, 2003).

La photochimie semble aussi affectée à la baisse. Après calculs des paramètres découlant de la cinétique de fluorescence, on constate que  $\Phi'_M$  (l'efficacité opérationnelle du PSII) est diminuée dès 24 heures (-31%) (Tableau 6.3.4.). On remarque aussi une baisse du transport des électrons ( $q_{PreI}$  -23% et  $q_P$  -65%) à 96 heures et une forte baisse de la dissipation non-photochimique ( $q'_{Nrel}$  -50% et  $q_N$  -36%). Nous avons observé une forte baisse de ces paramètres non-photochimiques lors des tests faits avec l'Aatrex, ce qui nous amène à penser que l'atrazine est le facteur majeur dans les effets observés avec les Primextra II magnum. La hausse de  $UQF_{rel}$  est très marquée, ce qui indique un fort blocage et l'inaptitude du PSI à drainer les électrons de la chaîne de transport des électrons.

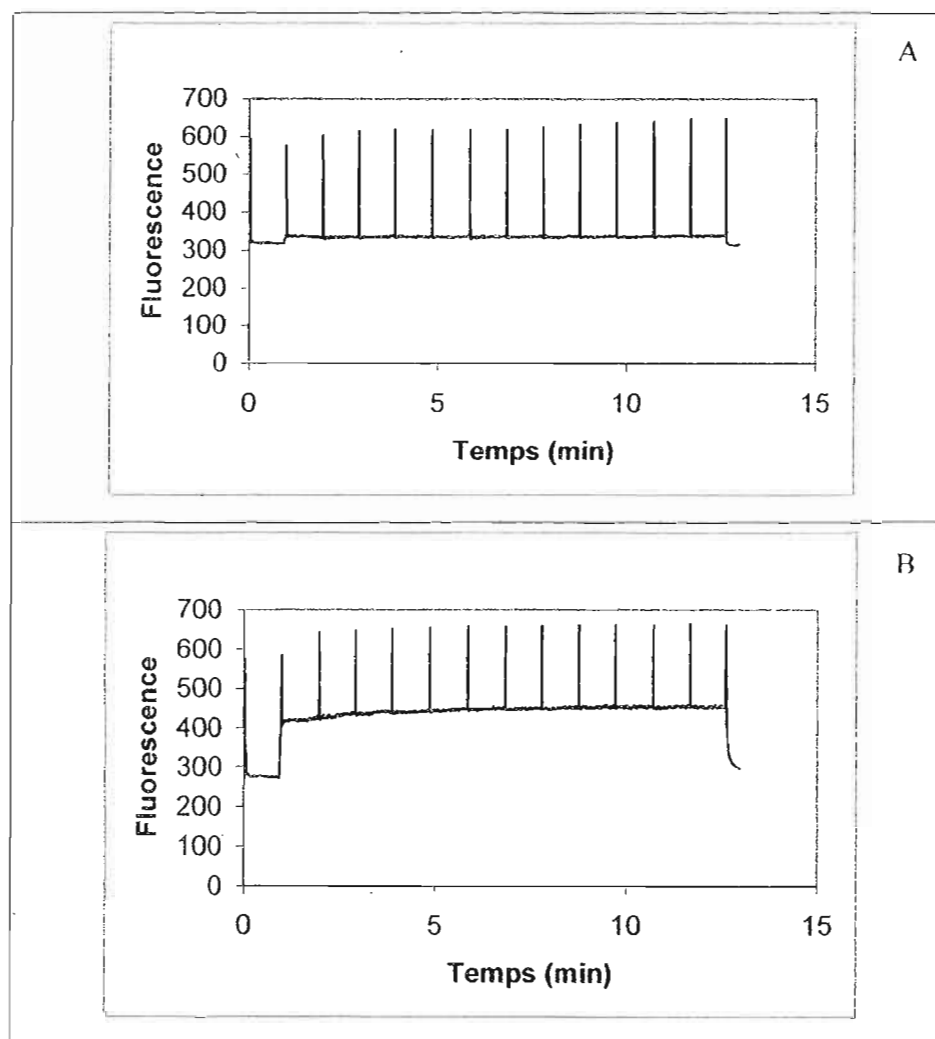


Figure 6.3.9. Cinétique de fluorescence obtenue au PAM pour UTCC 299 exposée à 0 (A) et 0,1  $\mu$ M (B) de Primextra II magnum pendant 96 heures.

Le *quenching* de haute énergie,  $q_E$ , est corrélé au gradient de protons ( $\Delta pH$ ) créé au travers de la membrane du thylacoïde (Briantais *et al.*, 1979 ; Ruban *et al.*, 1992). Beaucoup de mécanismes ont été proposés pour le  $q_E$ . Certains localisent l'effet *quenching* dans les pigments antennaires (Crofts et Yerkes, 1994; Demmig-Adams, 1990 ; Genty *et al.*, 1990 ; Ruban *et al.*, 1992). D'autres privilégient les centres réactionnels (Krieger *et al.*, 1992 ; Noctor et Horton, 1990 ; Schreiber et Neubauer, 1990). Le *quenching* se produisant au niveau des centres réactionnels

semble être plutôt un mécanisme de protection par la neutralisation de dangereux radicaux qui pourraient être produits par la photo-inhibition (Pospisil, 1997).

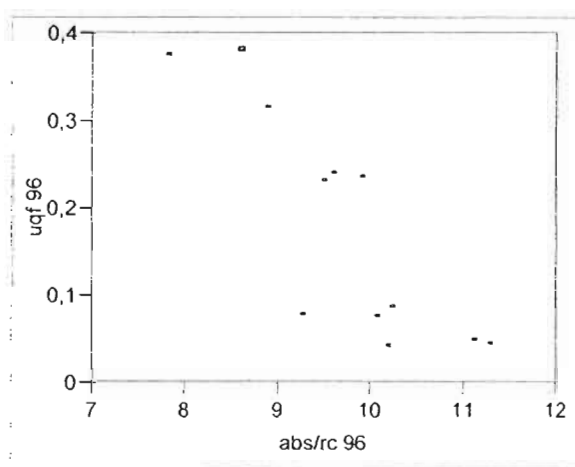


Figure 6.3.10. Relation entre le  $UQF_{rel}$  et la taille des antennes à 96 heures chez UTCC 299 exposée au Primextra II magnum. On obtient un  $R^2$  de 0,72.

On remarque à la figure 6.3.10. qu'il y a un fort lien ( $R^2$  de 0,72) entre la valeur du  $UQF_{rel}$  et la taille des antennes. Le niveau de réduction du PSII et de fluorescence augmentent considérablement lorsque la taille des antennes est réduite à cause de la présence du Primextra II magnum. Le blocage causé par l'herbicide est intense et ceci affecte grandement l'intégrité des antennes ou la capacité de celles-ci de transmettre les photons aux centres réactionnels.

Malgré le fait qu'il n'y ait pas de cycle des xanthophylles chez les cyanobactéries, la zéaxanthine, un pigment ayant un rôle protecteur contre la photo-inhibition, se retrouve en quantité chez les cyanobactéries (Ibelings *et al.*, 1994). La zéaxanthine peut probablement, selon Pospisil, (1997) «quencher» l'état singulet et triplet de la chlorophylle. Ce qui pourrait protéger l'organisme contre les effets néfastes des espèces radicalaires. Une espèce possédant un fort taux de zéaxanthine peut probablement «quencher» plus efficacement l'énergie excédentaire et être mieux protégée contre les espèces réactives oxygénées.

Frankart *et al.*, (2003) ont constaté chez *Lemna minor* exposée à de l'atrazine que la composante la plus impliquée dans les changements du paramètre NPQ est la composante  $q_E$ . Le paramètre NPQ était affecté à la baisse par la plus haute concentration testée (46  $\mu$ M). Nous constatons aussi une baisse de la valeur de NPQ (Tableau 6.3.4.). Pour Frankart *et al.*, (2003), des trois

composantes constituant le paramètre NPQ,  $q_E$  était la composante la plus inhibée. Cette baisse de la composante  $q_E$  était compensée par une hausse de  $q_T$ . Ce qui indique un mécanisme de protection basé sur le transfert antennaire. Horton et Hague, (1988) démontrèrent qu'une hausse de  $q_E$  était corrélée à une baisse de  $q_T$ . Dans notre cas, il serait bien possible que  $q_T$  soit à la base de la variation de NPQ lors de l'exposition de UTCC 299 au Primextra II magnum. Étant donné le fort blocage du transport des électrons, un gradient de pH élevé n'est pas en mesure de se faire. À 24 heures, le NPQ baisse beaucoup puis récupère un peu à 96 heures. À 96 heures, l'antenne diminue de grosseur, ceci pourrait être dû à une dégradation accrue de l'antenne collectrice de lumière (phycobilisomes) ou ceci put être aussi dû au déplacement latéral de l'antenne vers le PSI, ce qui amène une légère récupération de NPQ. Le mécanisme protège le PSII des dommages causés par la lumière mais ne semble pas suffisant pour empêcher la dégradation de la chlorophylle par les ERO puisque nous avons constaté une baisse de la concentration de chlorophylle à 96 heures associée avec une hausse des ERO.

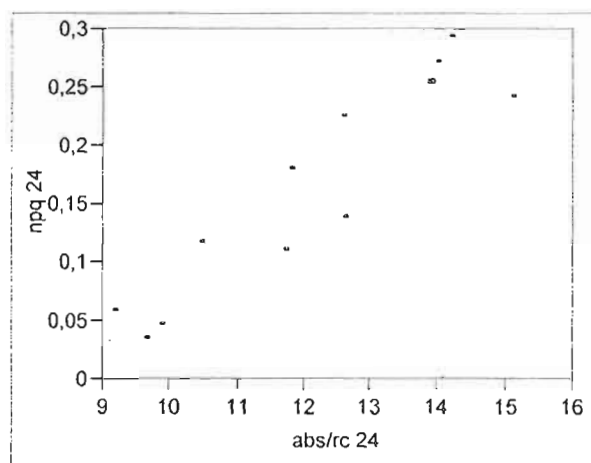


Figure 6.3.11. Relation entre le NPQ et la taille des antennes à 24 heures chez UTCC 299 exposée au Primextra II magnum. On obtient un  $R^2$  de 0,86.

La figure 6.3.11 indique qu'il y aurait un lien direct entre la taille des antennes du PSII et les valeurs du paramètre NPQ. Lorsque la taille des antennes diminue, le NPQ suit la même tendance. Tout concourt à penser que les antennes sont très affectées par l'herbicide et que celles-ci diminuent de taille, ce qui affecte l'efficacité du *quenching* non-photochimique. Une antenne moins fonctionnelle ne permet pas un transfert efficace de l'énergie lumineuse aux centres réactionnels qui transféreront leurs électrons vers la chaîne de transport des électrons.

De plus, le transport des électrons est diminué à cause du blocage causé par l'herbicide, donc le gradient de protons ne peut se faire efficacement et le *quenching* non photochimique est affecté négativement.

Tableau 6.3.4. Effets du Primextra II magnum sur les diverses voies de dissipation de l'énergie de UTCC 299 exposée pendant 24 heures et 96 heures. É-t signifie écart-type.

PRIMEXTRA II MAGNUM								
299		$\Phi'_M$	$q_{Prel}$	$q_{Nrel}$	$q_P$	$q_N$	UQF <sub>rel</sub>	NPQ
Témoin 24 h	moy	0,443	0,584	0,355	0,905	0,353	0,061	0,270
	É-t	0,008	0,014	0,014	0,003	0,013	0,002	0,019
0,1 $\mu$ M 24 h	moy	0,306*	0,526*	0,082*	0,573*	0,129*	0,392*	0,048*
	É-t	0,002	0,009	0,013	0,004	0,008	0,007	0,008
Variation vs tém 24 h		-31%	-10%	-77%	-37%	-63%	+543%	-82%
Témoin 96 h	moy	0,474	0,608	0,346	0,930	0,328	0,046	0,270
	É-t	0,004	0,002	0,002	0,003	0,008	0,002	0,004
0,1 $\mu$ M 96 h	moy	0,310*	0,467*	0,174*	0,565*	0,210	0,359*	0,119*
	É-t	0,006	0,027	0,051	0,008	0,053	0,026	0,044
Variation vs tém 96 h		-35%	-23%	-50%	-65%	-36%	+680%	-56%

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

Les effets de 0,1  $\mu$ M de Primextra II magnum notés sur les paramètres PAM sont significativement différents du témoin, et ce, dès 24 heures. À 24 heures, les effets de 0,01  $\mu$ M de l'herbicide sur les paramètres sont tous significativement différents du témoin sauf  $q_{Prel}$  mais ceci n'est plus le cas à 96 heures sauf pour  $q_P$  et UQF<sub>rel</sub>. Par contre, dès la concentration de 0,05  $\mu$ M les effets sont consistants autant à 24 heures qu'à 96 heures. Les différences sont significatives entre 0,01  $\mu$ M et 0,1  $\mu$ M à 24 heures pour tous les paramètres tandis qu'à 96 heures, les seuls paramètres qui soient significativement différents entre les concentrations de 0,01  $\mu$ M et 0,1  $\mu$ M sont  $\Phi'_m$ ,  $q_P$  et UQF<sub>rel</sub>.

### 6.3.7. PEA.

On voit à la figure 6.3.12. une cinétique rapide de UTCC 299 exposée à différentes concentrations de Primextra II magnum pendant 96 heures. Ce qu'on remarque surtout est la hausse du point d'inflexion de la courbe correspondant au point J lorsque UTCC 299 est exposée à la plus forte concentration. Cette hausse du point J indique un blocage du transport des électrons au niveau du PSII, et plus précisément entre les quinones A et B (Jansen et Pfister 1990; Van Rensen *et al.* 2001; Hiraki *et al.*, 2003).

Tous les paramètres biophysiques sont significativement différents à la concentration de 0,1  $\mu\text{M}$  à 24 heures et il en va de même à 96 heures. À 24 heures, la concentration de 0,01  $\mu\text{M}$  ne semble pas induire d'effets significatifs sauf sur les paramètres ETo/RC et TRo/RC. Les différences sont significatives entre les concentrations de 0,01  $\mu\text{M}$  et 0,1  $\mu\text{M}$  à 24 heures. L'effet majeur est au niveau du blocage du transport des électrons et cet effet se fait sentir rapidement.

À 24 heures, la grosseur efficace des antennes diminue fortement (-34%) puis celles-ci voient leurs transferts de photons vers les centres réactionnels récupérer un peu à 96 heures (-22%) (Tableau 6.3.5.). En fait, l'excitation des centres réactionnels est diminuée comme dans le cas de l'Aatrex probablement à cause de l'atteinte aux pigments des antennes externes qui sont dégradés et donc moins en mesure de transférer l'énergie vers la chlorophylle des centres réactionnels. Par contre, les hausses respectives des paramètres RC/CS (centres réactionnels actifs par section transversale de PSII) et RC/ABS (centres réactionnels actifs et participant à l'absorbance totale) de +51% et +29% à 24 heures montrent la possibilité d'une quantité accrue de chlorophylle, donc une plus grande probabilité de stimuler des centres réactionnels. Une probabilité d'excitation accrue de la chlorophylle mais des centres réactionnels recevant moins de photons. Ne pouvant se déplacer et atteindre la chaîne des électrons (baisse de TRo/RC ou baisse de la quantité d'électrons dépassant  $Q_A$ ), ceux-ci restent captifs du PSII. La taille des antennes diminue donc mais les centres réactionnels du PSII restent encore sollicités à cause du blocage. Nous pouvons donc supposer que ces électrons captifs peuvent créer des espèces réactives oxygénées. La dégradation de la chlorophylle après 96 heures fait diminuer ces paramètres et l'énergie lumineuse (photons) est plus concentrée aux centres réactionnels restants.

Tableau.6.3.5. Effets de 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra II magnum sur les paramètres biophysiques de UTCC 299 exposée pendant 24 heures et 96 heures. É-t signifie écart-type.

PRIMEXTRA II MAGNUM							
299		ABS/RC	ETo/RC	TRo/RC	DIO/RC	RC/CS	RC/ABS
Témoin 24 h	moy	14,461	1,464	3,997	-10,464	0,096	0,069
	É-t	0,418	0,086	0,050	0,428	0,004	0,002
0,1 $\mu\text{M}$ 24 h	moy	9,604*	0,138*	3,426*	-6,178*	0,162*	0,104*
	É-t	0,250	0,066	0,035	0,220	0,006	0,003
Variation vs tém 24 h		-34%	-91%	-14%	-41%	+69%	+51%
Témoin 96 h	moy	10,889	1,666	3,958	-6,931	0,145	0,092
	É-t	0,415	0,094	0,062	0,358	0,008	0,004
0,1 $\mu\text{M}$ 96 h	moy	8,456*	0,169*	3,392*	-5,064*	0,199*	0,119*
	É-t	0,388	0,094	0,069	0,323	0,013	0,006
Variation vs tém 96 h		-22%	-90%	-14%	-27%	+37%	+29%

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

Le paramètre ETo/RC (transport des électrons dans le PSII) est très fortement inhibé dès 24 heures (91%) tandis que la dissipation sous forme de chaleur est diminuée de 41% à 24 heures. Puis il y a une légère récupération à 96 heures. Il semble qu'un mécanisme de défense puisse être la cause de cette récupération, possiblement le déplacement de l'antenne résiduelle du PSII vers le PSI, ce qui peut expliquer la baisse des valeurs de ces paramètres (DIO/RC, RC/RC et RC/ABS).

On note un lien entre la taille des antennes (ABS/RC) et la granulosité à 96 heures avec un  $R^2$  de 0,67 (Figure 6.3.13.). Ce qui semble confirmer que les antennes et leur pigments sont très fortement impliqués dans les effets notés sur la photosynthèse. De même en est-il pour la grosseur de la cellule et la taille des antennes ( $R^2$  de 0,63) (Figure 6.3.14.). Lorsque les valeurs de ABS/RC diminuent, ces diminutions concordent généralement avec une baisse de la taille des cellules.



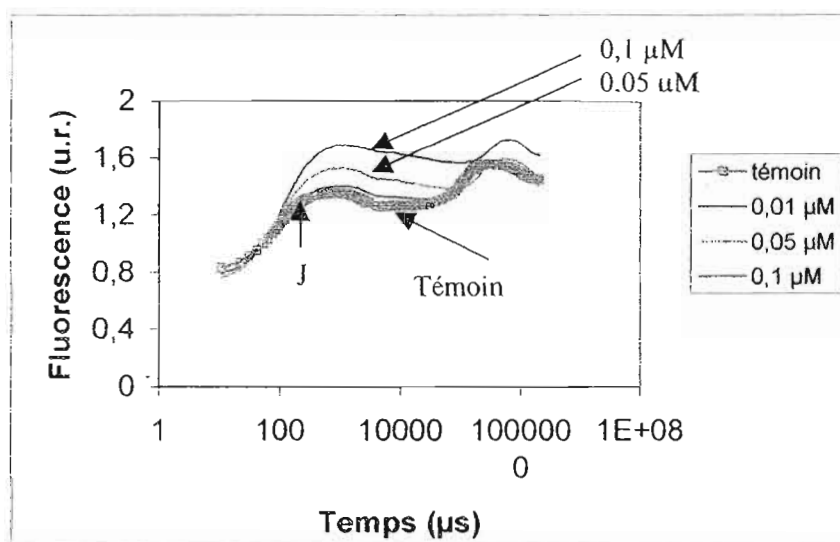


Figure 6.3.12. Courbe de cinétique rapide obtenue au PEA pour UTCC 299 exposée à 0, 0,01, 0,05 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra II magnum pendant 96 heures. La courbe en gras est le témoin.

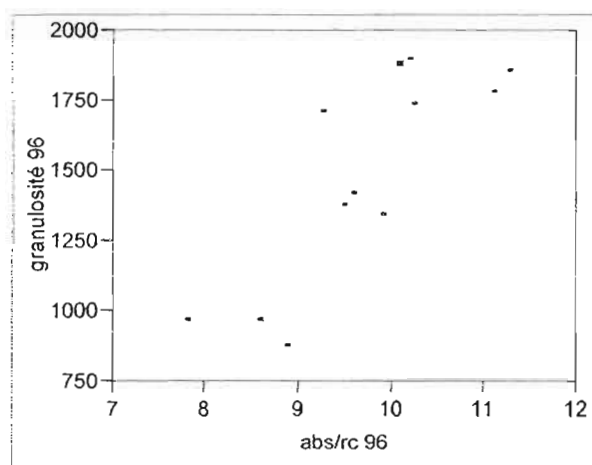


Figure 6.3.13. Relation entre la granulométrie et la taille des antennes lors de l'exposition de UTCC 299 au Primextra II magnum à 96 heures. On obtient un  $R^2$  de 0,67.

À la figure 6.3.13., on remarque que lorsque la granulométrie diminue, la taille des antennes diminue aussi. Les baisses simultanées de la granulométrie et de la taille des antennes constatées dans cette étude pourraient être dues à la formation des ERO notées à 24 heures et qui auraient détruits les pigments collecteurs de lumière.

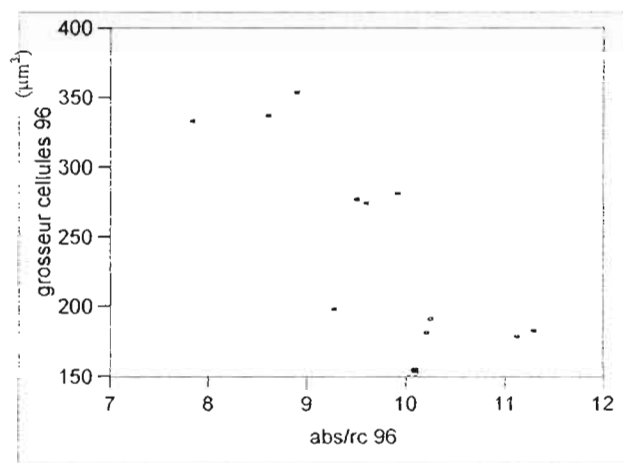


Figure 6.3.14. Relation entre la grosseur des cellules et la taille des antennes lors de l'exposition de UTCC 299 au Primextra II magnum à 96 heures. On obtient un  $R^2$  de 0,63.

#### 6.3.8. Analyse condensée.

L'effet de l'atrazine seul semble moins délétère que le mélange Primextra II magnum sur la croissance et sur le contenu en chlorophylle de UTCC 299. L'effet majeur dans le Primextra II magnum provient certainement de l'atrazine mais une autre composante dans le mélange exacerbe les effets délétères. Le métolachlore pourrait en être la cause. Étant un inhibiteur de la synthèse protéique, il pourrait porter atteinte à l'intégrité des membranes. Par contre, les résultats que nous avons obtenus avec le Dual ne semblent pas confirmer ce fait. Il n'est pas impossible que l'effet soit aussi causé par une autre substance, telle que le phytoprotecteur (Benoxacor). Nous allons aborder cette possibilité à la section 6.5.4.

Ce qui ressort surtout dans les effets du Primextra II magnum constatés est la présence des variations de l'état de la chlorophylle et des antennes. Il semble y avoir une relation entre la dissipation non-photochimique et l'état des antennes collectrices de lumière. Une baisse de la taille des antennes est liée avec une baisse de la dissipation non-photochimique tandis que lorsque la grosseur de l'antenne augmente, le *quenching* non-photochimique récupère. Une antenne moins présente ou moins apte à se déplacer afin d'équilibrer l'énergie lumineuse entre

les PSII et PSI pourrait affecter négativement le *quenching* non-photochimique. La légère récupération notée à 96 heures pourrait être due à une des composantes de NPQ appelée  $q_T$  qui est le *quenching* lié aux états de transitions. Cet état implique la phosphorylation du complexe de l'antenne collectrice de lumière du PSII (ACLI), ce qui amène sa dissociation du PSII et son déplacement vers le PSI afin de permettre une redistribution latérale du taux d'excitation et réduire l'excitation au PSII. Il est aussi possible que des complexes CP43' aient été créés à 24 heures et auraient subsisté à 96 heures qui permettraient une dissipation sous forme de chaleur accrue, ce qui a déjà été expliqué précédemment.

Collier *et al.*, (1994) déterminèrent, après avoir fait des spectres d'émission de fluorescence de cellules privées de certains nutriments, qu'il y avait une perte de fluorescence des molécules de chlorophylle associée avec l'antenne et les centres réactionnels du PSII. De plus, ils constatèrent un déclin simultané de l'évolution du dégagement d'oxygène. Par ailleurs, ils remarquèrent un déplacement du pic d'émission vers de plus hautes énergies (685 nm à 682 nm) et que l'épaule au niveau de 715 nm était fortement réduit et en déduisirent que l'énergie captée par le PBS était ré-émise par les accepteurs d'énergie finaux du PBS plutôt que transférée à la chlorophylle. Le pic à 685 nm est une combinaison de l'émission provenant de l'accepteur terminal d'énergie du PBS ( $\approx 680$  nm; Gantt, 1981) et de CP43, une des protéines liant la chlorophylle associée avec le PSII ( $\approx 686$  nm; Pakrasi *et al.*, 1985; Nilsson *et al.*, 1992; Haag *et al.*, 1993). Quand l'énergie captée par le phycobilisome est transférée efficacement à la chlorophylle du PSII, la composante de 686 nm du pic domine (Vernotte *et al.*, 1992). Un épaulement à 715 nm indique l'émission de fluorescence relative à la chlorophylle du PSI. Ces changements suggèrent que l'énergie lumineuse absorbée par le PBS n'était pas transférée efficacement à la chlorophylle du PSII (ou du PSI) mais était perdue en fluorescence par les accepteurs finaux d'énergie du PBS. En résumé, ceci suggérerait que le PBS est détaché du centre réactionnel et que ce détachement pourrait être en partie responsable de l'apparente inefficacité du *quenching* lié à l'état de transition (transfert de l'antenne du PSII vers le PSI). On pourrait alors constater une baisse du *quenching* non-photochimique comme ce que nous avons constaté à 24 heures (Tableau 6.3.4.). Dans le cas qui nous occupe, il n'y aurait probablement pas de destruction totale de l'antenne mais seulement une réduction de la taille de celle-ci. Il est alors possible que la composante  $q_T$  du *quenching* non-photochimique soit encore en partie fonctionnelle et permettrait à l'organisme de se défendre contre la photo-inhibition. Ce que pourrait montrer la légère récupération de NPQ à 96 heures (Tableau 6.3.4.). Le  $UQF_{rel}$  qui augmente à 24 heures (Tableau 6.3.4.) semble être lié à une hausse du contenu en chlorophylle *a*

du PSII, ceci est reflété par une augmentation (Tableau 6.3.5.) de la capacité d'absorbance par les centres réactionnels du PSII (RC/ABS). Il serait intéressant de doser la chlorophylle du PSI afin de constater à quel niveau se trouve la perte constatée et quelle en est l'ampleur. Le  $UQF_{rel}$  montant encore à 96 heures, on pourrait penser que le PBS résiduel en se joignant au PSI augmente son taux de chl *a* accessible à la stimulation, ce qui entraîne une ré-émission sous forme de fluorescence plus élevée surtout si le PSI a du mal à remplir son rôle de stabilisateur. Par contre, la redistribution de l'énergie entre les deux photosystèmes allège tout de même la stimulation des centres réactionnels du PSII ce qui pourrait expliquer la légère baisse des paramètres RC/CS et RC/ABS (Tableau 6.3.5).

Finalement, ce blocage du transport des électrons causé par la présence du Primextra II magnum est probablement la cause de la formation de ERO constatée à 24 heures. Par ailleurs, cette dégradation des pigments de l'antenne, diminuant la captation de l'énergie lumineuse, permet la baisse des ERO enregistrée à 96 heures. Frankart *et al.*, (2003), suggèrent que le flazasulfuron, un inhibiteur de la synthèse protéique, pourrait dérégler l'assemblage des complexes chlorophylle-protéine de l'antenne collectrice de lumière du PSII chez *Lemna minor*. Le métolachlore, un autre inhibiteur de la synthèse de protéines, pourrait avoir un effet semblable sur les phycobilisomes qui n'arrivent pas à se régénérer. Une dégradation des pigments pourrait amener une diminution de l'excitation des centres réactionnels. Par contre, au vu de nos résultats on ne peut qu'avancer une hypothèse et parler de possibilité. Par contre, une grande partie de l'énergie doit être ré-émise sous forme de fluorescence car il ne semble pas que la protection qui pourrait être créée par un état de transition soit suffisante.

Lorsque *Synechococcus* est privée de soufre ou d'azote, en plus de perdre son antenne constituée de phycobiliprotéines, le transport des électrons est inhibé (Collier *et al.*, 1994). L'étude d'émission de fluorescence montre que dans les premières phases du stress causé par le manque de nutriments, avant que le phycobilisome ne soit complètement dégradé, le phycobilisome (PBS) ne peut transmettre efficacement l'énergie aux molécules de chlorophylle du PSII (Collier *et al.*, 1994). Des mesures photo-acoustiques de cellules stressées dans lesquelles le phycobilisome est dégradé, indiquent que le PSI est encore actif dans la production d'ATP (Collier *et al.*, 1994). Certains pensent que le transport des électrons noté en présence de DCMU, un inhibiteur du transport des électrons au niveau du PSII, serait en fait lié au transport cyclique des électrons au niveau du PSI (Carpentier *et al.*, 1984; Malkin *et al.*, 1990; Herbert *et al.*, 1990). Collier *et al.*, (1994) mettent en lumière que même si le transport des électrons global

diminue fortement durant la privation nutritionnelle, le transport au niveau du PSI ne diminue pas. La production continue d'ATP à partir du flux cyclique d'électrons se trouvant au niveau du PSI peut donner suffisamment d'énergie pour les procédés métaboliques essentiels. L'élimination de la fonction du PSII dans la condition du manque de nutriments peut être avantageuse, car en absence de procédés anaboliques, la formation de molécules du PSII excitées pourraient amener la production de ERO. Un fort blocage de longue durée sur le transport des électrons, comme ce que nous constatons, pourrait mimer l'effet du manque de nutriments car les procédés métaboliques sont fortement ralentis (production de ATP déficiente) du fait du manque de gradients de protons au niveau de la plastoquinone, protons servant à la production d'ATP au niveau de l'*ATP synthase*.

Comme UTCC 299 perd ses pigments mais peut continuer à survivre, on peut penser que son transport cyclique des électrons au niveau du PSI pourrait être encore actif. Par contre, comme la plupart de la chlorophylle dans les cyanobactéries se trouve principalement au niveau de l'antenne du PSI (Manodori *et al.*, 1984 ; Bryant, 1986 ; Mimuro et Fujita, 1977 ; Fujita et Murakami, 1987 ; Manodori et Melis, 1985), la forte baisse de chlorophylle *a* enregistrée chez UTCC 299 exposée pendant 96 heures au Primextra II magnum pourrait être liée en bonne partie à celle du PSI (en assumant une antenne interne de taille constante). Si la chlorophylle du PSI est fortement dégradée, la fonction «soupape de sécurité du PSI» en cas de blocage du transport des électrons pourrait être affectée, ce qui peut expliquer la baisse de croissance du fait du manque de ATP formé. La hausse du niveau F<sub>s</sub> constatée au PAM (Figure 6.3.5.) indique un PSI déficient dans son rôle de drainage des électrons du PSII. Un autre facteur serait à considérer, le ratio PSII/PSI qui peut varier d'une espèce à l'autre et même selon les conditions d'illumination. On s'est déjà posé la question: comment les plantes peuvent-elles avoir une photosynthèse efficace quel que soit l'environnement lumineux ? Des travaux mettent en lumière le fait qu'un ajustement dans le ratio des photosystèmes dans les thylacoïdes peut être une explication pour obtenir une efficacité photochimique maximale dans diverses conditions lumineuses. Ce mécanisme d'ajustement est ubiquitaire dans la nature car tous les organismes pouvant dégager de l'oxygène sont connus pour le posséder (Kawamura *et al.*, 1979 ; Murakami et Fujita, 1988 ; Melis et Harvey, 1981 ; Wilhelm et Wild, 1984). Les changements dans la composition des thylacoïdes est une réponse à long terme mais parfaitement réversible. On peut penser qu'un ratio plus élevé de PSII/PSI peut permettre une plus grande efficacité.

La formation de ERO notée à 24 heures semble être liée à la hausse de la quantité de chlorophylle. Si le contenu en chlorophylle augmente, on peut s'attendre à ce que le PSII soit surexcité surtout s'il existe un blocage du transport des électrons au niveau de la quinone A. Les électrons étant retenus un certain temps prisonnier du complexe, ils peuvent être en mesure de permettre la création des espèces réactives oxygénées. *A contrario*, une baisse de la quantité de pigments, probablement due à la destruction par les ERO, diminuera les probabilités de formation des ERO. Un déplacement de l'antenne du PSII, en permettant de redistribuer l'énergie, diminuera d'autant ces probabilités.

À 96 heures, la baisse du *quenching* non-photochimique est du même ordre de grandeur dans le cas des deux herbicides (Primextra II magnum et Aatrex). Par contre, on ne note pas de récupération à 96 heures par rapport à 24 heures lors des traitements avec l'Aatrex comme ce fut le cas avec Primextra II magnum. Mais, au final, l'effet de l'Aatrex a une intensité très légèrement moindre que dans le cas de Primextra II magnum. On voit, ici aussi, une hausse de  $UQF_{rel}$  qui indique un fort blocage du transport électronique et une moins bonne capacité du PSI de drainer les électrons vers lui. L'intensité de la ré-émission de fluorescence lors des traitements avec l'Aatrex est toutefois moins élevée que dans le cas du Primextra II magnum. On peut en déduire que l'atrazine seule affecte moins le complexe antennaire que le mélange, du moins à 24 heures.

On remarque que le volume cellulaire est affecté à la baisse dans le cas des deux herbicides. Par contre, l'atteinte est moins grande avec l'Aatrex. Il est possible que l'une des substances du mélange Primextra soit la cause de la grande baisse du volume cellulaire, ce qui peut augmenter la surface spécifique. Nous pouvons donc assumer qu'une des substances dans le Primextra II magnum exacerbe cet effet. La diminution du volume cellulaire peut augmenter la surface spécifique et augmenter la prise en charge (uptake) de la substance délétère. Weiner *et al.* (2004) montrent avec leur étude, qu'en général, la prise en charge de l'atrazine est plus élevée avec les algues de plus petit volume. La sensibilité de l'algue est aussi corrélée avec la prise en charge de la substance toxique.

À 96 heures, UTCC 299 exposée à 0,1  $\mu$ M d'Aatrex montre une baisse de la granulosité de 30% tandis que dans le cas du Primextra II magnum à la même concentration, la baisse était de 49%. Il semble que le Primextra atteigne plus fortement le système antennaire de UTCC 299 ou l'intégrité des différents pigments.

UTCC 299 exposée à de l'atrazine seul (Aatrex) présente sensiblement les mêmes effets que ceux observés pour le Primextra II magnum. Toutefois, l'atteinte sur le transport des électrons est moins sévère avec l'Aatrex.

#### 6.4. PRIMEXTRA RECONSTITUÉ.

Le primextra est un herbicide constitué de métolachlore et d'atrazine. La solution commerciale comporte aussi du phytoprotecteur appelé Benoxacor. La solution reconstituée est faite à partir d'une solution d'Aatrex (atrazine) et d'une solution de Dual (métolachlore sans Benoxacor) et de Benoxacor dissous dans du méthanol à concentration finale de 0.05%. La solution reconstituée permettra de discriminer les effets des différents produits composant la solution commerciale.

##### 6.4.1. Croissance.

On ne note pas d'effets sur la croissance de UTCC 299 (Figure 6.4.1.) à 48 heures quelle que soit la condition testée de primextra reconstitué avec ou sans Benoxacor. Par contre, la croissance est fortement inhibée à 96 heures pour les cellules dans la solution contenant le phytoprotecteur (Figure 6.4.2.) (Tableau 6.4.1.). Il y a une inhibition de la croissance pour les échantillons testés avec le primextra reconstitué sans phytoprotecteur mais l'ampleur de la baisse est nettement moindre. L'effet est donc lent et aurait pu provenir du métolachlore car cet herbicide affecte la synthèse des lipides et des protéines et agit lentement. Pourtant aucun effet négatif du métolachlore sur la croissance n'a été noté lors des précédents tests faits avec cet herbicide. L'effet délétère proviendrait fort possiblement du phytoprotecteur Benoxacor.

Tableau 6.4.1. Croissance de UTCC 299 exposée à 0, 0,1 $\mu$ M Aatrex, 0,1 $\mu$ M Aatrex avec benoxacor 2% (p/p) et 0,1 $\mu$ M Aatrex avec benoxacor 4% (p/p) selon le dénombrement de cellules avec le Coulter Counter Multisizer III. B signifie Benoxacor. Les unités représentent le nombre de fois une population est doublée par jour (dble d<sup>-1</sup>).

Jours	0 $\mu$ M	0,10 $\mu$ M	0,10 $\mu$ M+ B2%	0,10 $\mu$ M+ B4%
4	0,477 $\pm$ 0,002	0,418 $\pm$ 0,014	*0,192 $\pm$ 0,041	*0,194 $\pm$ 0,018

\* significativement différent du témoin (P < 0,05)



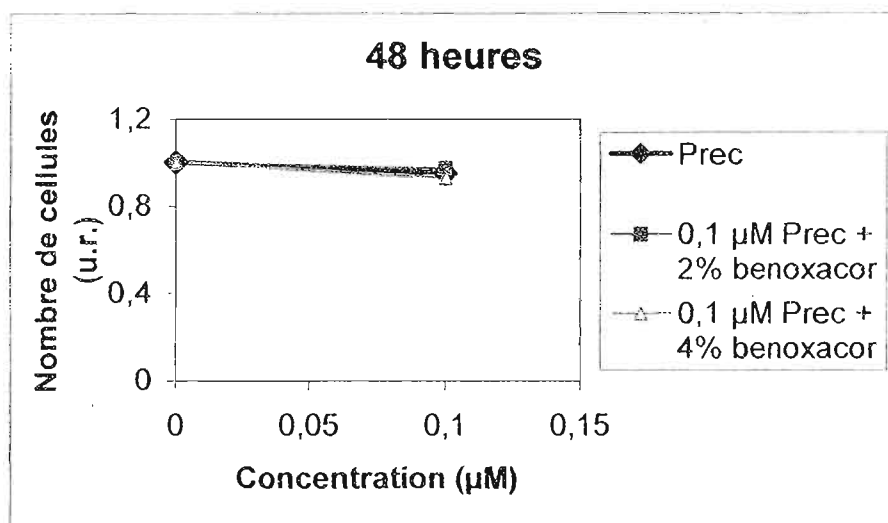


Figure. 6.4.1. Courbe représentant la croissance cellulaire de UTCC 299 exposée à 0 et 0,1 µM de Primextra reconstitué sans et avec le phytoprotecteur Benoxacor après 48 heures. Les concentrations de Benoxacor testées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p). Prec signifie Primextra reconstitué.

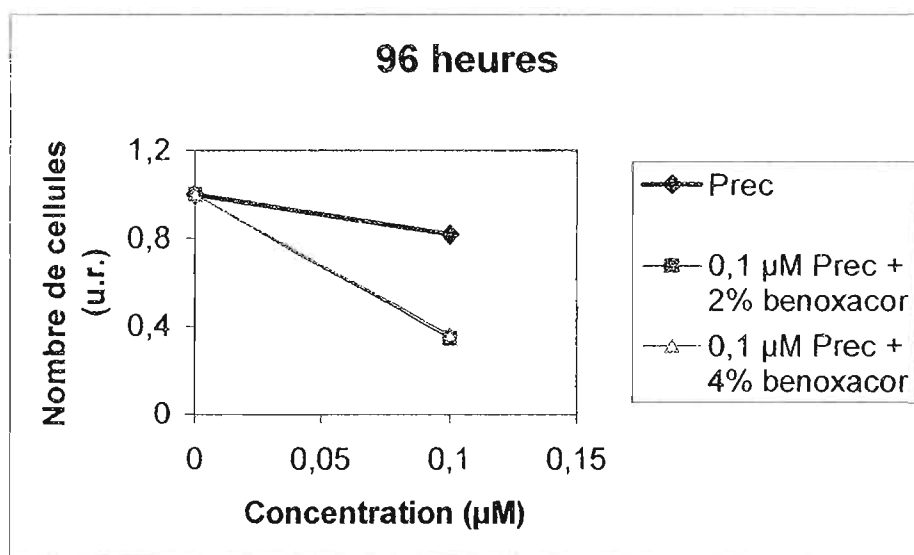


Figure. 6.4.2. Courbe représentant la croissance cellulaire de UTCC 299 exposée à 0 et 0,1 µM de Primextra reconstitué sans et avec le phytoprotecteur Benoxacor après 96 heures. Les concentrations de Benoxacor testées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p). Prec signifie Primextra reconstitué.

Par contre, l'inhibition de croissance sur UTCC 299 par la solution de Primextra reconstitué est la même quelle que soit la concentration de Benoxacor ajoutée (2% ou 4% p/p), la plus faible concentration de Benoxacor ayant le même effet que la plus forte.

Un test sur la croissance avec le méthanol a été fait afin de vérifier que cette baisse de croissance ne provienne pas exclusivement du solvant ayant servi à dissoudre le Benoxacor mais l'effet du méthanol ne change rien à la tendance observée.

#### 6.4.2. Volume cellulaire.

Il est intéressant de constater que le Primextra reconstitué (sans Benoxacor) affecte le volume cellulaire, le faisant baisser (Tableau 6.4.2. et Annexe B.3.). L'ajout du Benoxacor amène une baisse du volume cellulaire encore plus marquée. Des tests ont été faits dans un autre temps afin de vérifier les effets possibles de la concentration de méthanol utilisée afin de dissoudre le Benoxacor ajouté dans les solutions de primextra reconstitué.

Un témoin avec la présence du solvant (méthanol) a donc été utilisé en deuxième instance (Tableaux 6.4.2.) afin de vérifier si le Benoxacor est vraiment responsable de la baisse accrue du volume cellulaire lorsque le phytoprotecteur est ajouté à la solution. Le méthanol affecte le volume cellulaire à la baisse mais en tenant compte de sa présence, il semble toutefois que le benoxacor ait bien une influence sur les diverses variations des volumes cellulaires constatées lors des traitements faits avec les herbicides Primextra II magnum et Aatrex.

L'effet du primextra reconstitué sans Benoxacor sur le volume cellulaire de UTCC 299 n'est pas aussi évident que la solution contenant le Benoxacor, ce qui confirmerait le fait que le Benoxacor soit impliqué dans les effets sur les volumes cellulaires constatés.

Les variations de volume cellulaire ont été analysées par le test de t en prenant comme témoin l'échantillon non traité mais ayant du méthanol dans son milieu de culture afin de discriminer l'effet du méthanol sur les volumes cellulaires. Malgré l'effet du méthanol sur les cellules, on note toutefois un effet significatif des différents traitements sur le volume cellulaire.

Tableau 6.4.2. Effets de 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra reconstitué avec et sans le phytoprotecteur Benoxacor sur le volume cellulaire de UTCC 299 exposée pendant 24 et 96 heures. Un témoin exposé au solvant méthanol a aussi été utilisé afin de discriminer l'effet de celui-ci sur les résultats. PR signifie Primextra reconstitué. Les concentrations de Benoxacor testées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p).

Traitement	Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	
	24 heures	96 heures
Témoin	83,95	81,74
Écart-type	$\pm 2,05$	$\pm 2,02$
0,1 $\mu\text{M}$ PR	78,77	73,60*
Écart-type	$\pm 1,13$	$\pm 1,17$
0,1 $\mu\text{M}$ PR+2%	76,75	68,76*
Écart-type	$\pm 0,44$	$\pm 0,41$
0,1 $\mu\text{M}$ PR+4%	76,32*	67,97*
Écart-type	$\pm 0,22$	$\pm 0,97$
Témoin MeOH	77,16	72,65
Écart-type	$\pm 0,13$	$\pm 1,28$

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

On remarque que la présence du phytoprotecteur Benoxacor induit une baisse du volume cellulaire, ce qui pourrait expliquer la hausse de toxicité du Primextra II magnum. En effet, une baisse du ratio surface : volume permet, dans certains cas, une captation des toxiques plus grande d'où une toxicité accrue.

#### 6.4.3. PAM

À 24 heures, les valeurs des paramètres de la photosynthèse des échantillons traités au Primextra reconstitué avec du Benoxacor [2% (p/p)] et sans Benoxacor diffèrent au niveau des *quenchings* non-photochimiques  $q_{Nrel}$ ,  $q_N$  et NPQ (Tableaux 6.4.3. et 6.4.4.). Ces paramètres subissent une baisse plus marquée lors des traitements ayant du Benoxacor par rapport au

Primextra reconstitué sans Benoxacor. Par contre, lorsque comparés aux témoins tous les paramètres représentant les *quenchings* non-photochimiques ( $q_{Nrel}$ ,  $q_N$ , NPQ) baissent. Le paramètre  $UQF_{rel}$  augmente pour tous les traitements tandis que le  $q_{Prel}$  augmente un peu à 24 heures avec les traitements possédant du Benoxacor puis baisse à 96 heures et que  $q_P$  baisse pour tous les traitements mais de façon plus marquée à 96 heures. Cette différence provient de la façon de calculer  $q_{Prel}$  et  $q_P$  qui diffère un peu. Le paramètre  $q_{Prel}$  utilise le  $F_M$  et  $q_P$  le  $F'_M$ . Se trouvant au dénominateur, le  $F_M$  qui subit une forte baisse lors des traitements peut affecter grandement la valeur du résultat, la haussant quelque peu. Le paramètre  $q_{Prel}$  serait probablement plus adéquat et plus sensible dans ce cas-ci car il reflète plus les changements que le Benoxacor induit.

Les différents effets sur la photosynthèse sont sensiblement plus marqués à 96 heures. Une baisse de  $\Phi'_M$  de 13 % pour les échantillons sans Benoxacor versus 68% pour ceux qui en contiennent une concentration de 2% (p/p). Par contre, on note une récupération du paramètre  $q_{Nrel}$  qui remonte légèrement lorsqu'il y a du Benoxacor dans le milieu lorsque comparé au Primextra sans Benoxacor. Curieusement, la tendance est inversée dans le cas du NPQ, i.e. qu'on note une baisse de la valeur du paramètre lors de la présence du phytoprotecteur dans le milieu. Le *quenching* non-photochimique est particulièrement affecté par la substance.  $UQF_{rel}$  se démarque par sa forte hausse dans tous les cas de figure mais la présence du Benoxacor semble exacerber cet effet. De plus, la photochimie baisse aussi beaucoup lorsqu'il y a du Benoxacor dans le milieu. À la lumière de ces résultats, il est de plus en plus clair que le Benoxacor est un facteur important dans les effets notés avec le Primextra II magnum. On sait que le métolachlore, de par son mode d'action, prend au moins 48 heures avant d'affecter l'organisme, c'est pourquoi les effets prennent un certain temps avant qu'on puisse les remarquer d'une manière indubitable. La différence ne pourrait provenir que du métolachlore dans le milieu et pas nécessairement du Benoxacor mais les tests faits avec le Dual sans Benoxacor et ceux faits avec le Dual II magnum (avec Benoxacor) n'ont pas montré d'effets notables même après 96 heures. On pourrait penser que les deux substances, métolachlore et Benoxacor entrent en compétition, ce qui empêcherait le Benoxacor de se fixer, ce qui pourrait expliquer en partie la récupération notée avec le  $q_N$ . Dans le Primextra II magnum, le métolachlore est présent. mais l'atrazine est l'agent qui agit principalement. Une baisse de la grosseur des cellules, et par le fait même le ratio surface : volume, induite par la présence du Benoxacor peut permettre de capter plus d'atrazine amplifiant ainsi les effets. On peut aussi

penser que cette baisse de la grosseur des cellules soit en fait le résultat d'un effet additif entre les deux substances, atrazine et Benoxacor.

$UQF_{rel}$  est augmentée de 543% à 24 heures et de 680% à 96 heures pour les échantillons traités au Primextra II magnum tandis que dans le cas de la reconstitution avec 2% (p/p) de Benoxacor, l'augmentation est de 464% à 24 heures et de 725% à 96 heures. Les effets concordent bien même s'ils sont un peu plus marqués avec la reconstitution après 96 heures. La concentration de Benoxacor que nous avons utilisée est légèrement plus élevée que dans la solution commerciale. Le Primextra II magnum contient 1,8 % (p/p) de Benoxacor. Lorsqu'on compare les effets de la solution herbicide commerciale (Primextra II magnum) versus ceux de la solution reconstituée, on remarque que les effets sont très semblables. À 24 heures, le  $q_{Nrel}$  obtenu avec la solution de Primextra II magnum se trouve diminué par rapport au témoin de 77% et à 96 heures de 50% (Tableau 6.1.4.). Dans le cas de la reconstitution avec Benoxacor 2% (p/p) nous avons une baisse du paramètre de 66% à 24 heures et de 32% à 96 heures (Tableau 6.4.4.). Une concentration double de Benoxacor ne semble pas augmenter les effets de beaucoup comme on pourrait s'y attendre. Le  $q_{prel}$  diminue à 96 heures de 23% avec le Primextra II magnum et de 29% avec notre reconstitution.

Des tests ont été faits avec le Benoxacor seul afin de déterminer si sa présence peut affecter la photosynthèse. Les résultats obtenus confirment le fait qu'il se pourrait que le phytoprotecteur soit le principal facteur responsable des effets différents de Aatrex et de Primextra II magnum sur la photosynthèse comme nous le verrons dans la section 6.5.

Tableau 6.4.3. Effets de 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra reconstitué avec et sans le phytoprotecteur Benoxacor sur les diverses voies de dissipation de l'énergie de UTCC 299 exposée pendant 24 et 96 heures. PR signifie Primextra reconstitué. Les concentrations de Benoxacor ajoutées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p). La ligne en grisé est la reconstitution de Primextra avec une concentration de Benoxacor de 2% (p/p). É-t signifie écart-type.

RECONSTITUTION DE PRIMEXTRA II MAGNUM								
299		$\Phi'_M$	$q_{\text{Prel}}$	$q_{\text{Nrel}}$	$q_P$	$q_N$	UQFrel	NPQ
Témoin 24 h	moy	0,449	0,534	0,424	0,928	0,422	0,042	0,363
	É-t	0,006	0,042	0,047	0,003	0,048	0,005	0,065
0,1 $\mu\text{M}$ PR+0%	moy	0,370*	0,556	0,208*	0,702*	0,236*	0,236*	0,139*
	É-t	0,003	0,004	0,008	0,005	0,007	0,005	0,005
0,1 $\mu\text{M}$ PR+2%	moy	0,363*	0,617	0,145*	0,722*	0,188*	0,237*	0,085*
	É-t	0,006	0,010	0,005	0,010	0,006	0,008	0,003
0,1 $\mu\text{M}$ PR+4%	moy	0,373*	0,672	0,091*	0,741*	0,139*	0,237*	0,052*
	É-t	0,015	0,019	0,042	0,022	0,031	0,029	0,026
Témoin 96 h	moy	0,453	0,564	0,395	0,933	0,394	0,040	0,318
	É-t	0,010	0,018	0,021	0,003	0,019	0,003	0,020
0,1 $\mu\text{M}$ PR+0%	moy	0,393*	0,578	0,211*	0,733*	0,234*	0,211*	0,144*
	É-t	0,033	0,051	0,011	0,060	0,014	0,046	0,008
0,1 $\mu\text{M}$ PR+2%	moy	0,145*	0,403*	0,267*	0,550*	0,309*	0,330*	0,096*
	É-t	0,016	0,020	0,007	0,030	0,008	0,024	0,007
0,1 $\mu\text{M}$ PR+4%	moy	0,158*	0,411*	0,277*	0,567*	0,315*	0,313*	0,106*
	É-t	0,024	0,018	0,004	0,023	0,013	0,016	0,011

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

Les résultats sont en grande majorité significativement différents du témoin.

Tableau 6.4.4. Variation des effets de 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  de l'herbicide reconstitué Primextra avec et sans le phytoprotecteur Benoxacor sur UTCC 299 exposée pendant 24 et 96 heures. Les valeurs sont représentées en pourcentage par rapport au témoin. PR signifie Primextra reconstitué. Les concentrations de Benoxacor ajoutées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p). La ligne en grisé est la reconstitution de Primextra avec une concentration de Benoxacor de 2% (p/p).

RECONSTITUTION DE PRIMEXTRA II MAGNUM								
299		$\Phi'_M$	$q_{\text{Prel}}$	$q_{\text{Nrel}}$	$q_P$	$q_N$	$UQ_{\text{Frel}}$	NPQ
24 h								
0,1 $\mu\text{M}$ PR+0%	%	-18	+4	-51	-24	-44	+462	-62
0,1 $\mu\text{M}$ PR+2%	%	-19	+16	-66	-22	-55	+464	-77
0,1 $\mu\text{M}$ PR+4%	%	-17	+26	-79	-20	-67	+464	-86
96 h								
0,1 $\mu\text{M}$ PR+0%	%	-13	+2	-47	-21	-41	+428	-55
0,1 $\mu\text{M}$ PR+2%	%	-68	-29	-32	-41	-22	+725	-70
0,1 $\mu\text{M}$ PR+4%	%	-65	-27	-30	-39	-20	+683	-67

#### 6.4.4. PEA.

À 24 heures, le Primextra reconstitué et les échantillons avec du Benoxacor ne montrent pas de différences très marquées dans leurs effets sur ETo/RC et TRo/RC (Tableaux 6.4.6. et 6.4.7.). Par contre, à la concentration de Benoxacor la plus élevée (4%), on voit une augmentation du nombre de centres réactionnels actifs par section transversale (+54% pour RC/CS) et participant à l'absorbance totale (+35% pour RC/ABS), une baisse (-38%) de la dissipation de l'excitation (D<sub>Io</sub>/RC) et une baisse de la taille des antennes (-27%). À la lumière de ces résultats on peut dire que le Benoxacor a possiblement une incidence sur l'antenne, sur sa conformation ou son déplacement.



Tableau 6.4.5. Effets de 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra reconstitué avec et sans le phytoprotecteur Benoxacor sur les paramètres biophysiques de UTCC 632 exposée pendant 24 et 96 heures. PR signifie Primextra reconstitué. Les concentrations de Benoxacor ajoutées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p). La ligne en grisé est la reconstitution de Primextra avec une concentration de Benoxacor de 2% (p/p). É-t signifie écart-type.

RECONSTITUTION DE PRIMEXTRA II MAGNUM							
299		ABS/RC	ETo/RC	TRo/RC	Dlo/RC	RC/CS	RC/ABS
Témoin 24 h	moy	10,403	1,512	3,884	-6,519	0,154	0,096
	É-t	0,312	0,047	0,036	0,278	0,007	0,003
0,1 $\mu\text{M}$ PR+0%	moy	8,798*	0,804*	3,476*	-5,322*	0,192*	0,115*
	É-t	0,225	0,028	0,029	0,200	0,008	0,003
0,1 $\mu\text{M}$ PR+2%	moy	8,368*	0,782*	3,462*	-4,905*	0,198*	0,117*
	É-t	0,267	0,020	0,046	0,221	0,011	0,004
0,1 $\mu\text{M}$ PR+4%	moy	7,558*	0,782*	3,495*	-4,063*	0,238*	0,130*
	É-t	0,052	0,019	0,053	0,071	0,014	0,004
Témoin 96 h	moy	10,603	1,709	3,866	-6,747	0,150	0,095
	É-t	0,593	0,251	0,102	0,659	0,014	0,005
0,1 $\mu\text{M}$ PR+0%	moy	8,899*	0,918*	3,475*	-5,424*	0,185*	0,112*
	É-t	0,093	0,127	0,068	0,155	0,005	0,001
0,1 $\mu\text{M}$ PR+2%	moy	20,637*	0,712*	3,477*	-17,160*	0,059*	0,049*
	É-t	1,270	0,038	0,073	1,304	0,005	0,003
0,1 $\mu\text{M}$ PR+4%	moy	20,749*	0,829*	3,582*	-17,167*	0,060*	0,049*
	É-t	2,561	0,025	0,023	2,539	0,008	0,006

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

À 96 heures, le flux d'énergie véhiculé par l'antenne vers les centres réactionnels (ABS/RC) est fortement augmenté avec un traitement au Benoxacor ce qui est différent des effets précédents avec le Primextra II magnum. Par contre, nous avons remarqué que la quantité de photons incidents captés par les centres réactionnels récupérait quelque peu à 96 heures, ce qui aurait pu être dû au fait que les centres réactionnels encore fonctionnels se partageraient une plus grande tranche de l'énergie. Les paramètres RC/CS et RC/ABS montent à 24 heures comme c'était le cas avec le Primextra II magnum mais baissent beaucoup à 96 heures, ce qui est différent des résultats obtenus au Primextra II magnum qui montraient une baisse de ces paramètres par



rapport à 24 heures mais de faible amplitude. Les pigments pourraient réagir de la même façon que précédemment et être dégradés, ce qui pourrait expliquer la baisse des valeurs des paramètres RC/CS et RC/ABS.

La dissipation D1o/RC récupère très fortement à 96 heures. Nous voyons un peu de cette tendance avec le Primextra II magnum mais de bien moindre amplitude

Tableau 6.4.6. Variation des effets de 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  de l'herbicide reconstitué Primextra avec et sans le phytoprotecteur Benoxacor sur UTCC 299 exposée pendant 24 et 96 heures. Les valeurs sont représentées en pourcentage par rapport au témoin. PR signifie Primextra reconstitué. Les concentrations de Benoxacor ajoutées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p). La ligne en grisé est la reconstitution de Primextra avec une concentration de Benoxacor de 2% (p/p).

RECONSTITUTION DE PRIMEXTRA II MAGNUM							
299		ABS/RC	ETo/RC	TRo/RC	D1o/RC	RC/CS	RC/ABS
24 h							
0,1 $\mu\text{M}$ PR+0%	%	-15	-47	-11	-18	+25	+20
0,1 $\mu\text{M}$ PR+2%	%	-20	-48	-11	-25	+29	+22
0,1 $\mu\text{M}$ PR+4%	%	-27	-48	-10	-38	+54	+35
96 h							
0,1 $\mu\text{M}$ PR+0%	%	-16	-46	-10	-20	+23	+19
0,1 $\mu\text{M}$ PR+2%	%	+94	-58	-10	+154	-61	-49
0,1 $\mu\text{M}$ PR+4%	%	+96	-52	-7	+154	-60	-48

La seule chose qui ressort clairement pourrait être une implication du Benoxacor sur les effets sur l'antenne ou sur le transport antennaire. Il pourrait probablement aussi être impliqué dans le blocage des électrons. En bref, à 24 heures, il y aurait une augmentation de la chlorophylle (possiblement un phénomène compensatoire pour contrer la baisse d'énergie fournie aux centres réactionnels) qui ferait augmenter les probabilités que des photons soient absorbés et participeraient à l'absorbance totale mais ces centres réactionnels se partageraient l'énergie

résiduelle que l'antenne serait encore en mesure de distribuer. Étant donné la baisse de la capacité de captation des antennes, cette énergie serait limitée, d'où une baisse de la quantité de photons incidents par centres réactionnels (ABS/RC). À 96 heures, cette chlorophylle seraient détruite en partie et il y aurait donc moins de centres réactionnels actifs et en mesure de participer à l'absorbance totale. De plus, les quelques chlorophylles *a* résiduelles se partageraient l'excitation lumineuse restante. Ces quelques centres réactionnels fonctionnels seraient sur-excités à cause du blocage généré par la substance toxique. Ici aussi, on pourrait encore penser que cette chlorophylle excédentaire serait celle des complexes CP43'.

## 6.5. BENOXACOR

### 6.5.1. Croissance.

La souche toxique de *Microcystis aeruginosa* UTCC 299 est très sensible au Benoxacor seul ou avec de l'Aatrex. Nous notons qu'il y a une très forte inhibition de la croissance de la cyanobactérie. Par contre, l'effet sur la croissance semble être principalement dû à la présence du Benoxacor car la présence d'atrazine ne semble pas influencer plus fortement sur la croissance de la cyanobactérie.

Tableau 6.5.1. Détermination du taux de croissance de UTCC 299 exposée à du Benoxacor 2% (p/p) et 0,1 $\mu$ M de Aatrex plus 2% de Benoxacor (p/p) selon le dénombrement de cellules avec le Coulter Counter Multisizer III. B signifie Benoxacor et AA est l'Aatrex. Les unités représentent le nombre de fois une population est doublée par jour (dble d<sup>-1</sup>).

Jours	0 $\mu$ M	B2% + 0 $\mu$ M	0,10 $\mu$ M AA + B2%
4	0,397	0,090	0,111

### 6.5.2. Volume cellulaire.

Le Benoxacor influe sur le volume cellulaire en le diminuant (-13%) (Tableau 6.5.2.). Lorsqu'il y a de l'Aatrex en sus dans le milieu, il semblerait que le volume diminue légèrement plus mais l'écart est trop faible pour l'affirmer de manière définitive. Par contre, on peut dire que la présence du Benoxacor en diminuant le volume cellulaire et en augmentant le ratio surface : volume pourrait rendre les cellules plus sensibles aux toxiques. En effet, la hausse de la surface spécifique peut augmenter la prise en charge de l'atrazine.

Tableau 6.5.2. Volumes cellulaires lorsque UTCC 299 est exposée au phytoprotecteur Benoxacor 2% (p/p) seul et conjointement à 0,1 d'Aatrex pendant 96 heures. Les résultats sont en valeurs absolues.

Traitement	Volume ( $\mu\text{m}^3$ )
	96heures
Témoins	79,31
Écart-type	$\pm 0,72$
Benoxacor 2% (P/P)	69,27 *
Écart-type	$\pm 2,48$
0,1 $\mu\text{M}$ AA +2% (p/p) Ben	69,05 *
Écart-type	$\pm 1,01$

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

### 6.5.3. PAM

Pour UTCC 299, on ne note pas vraiment de différence entre les effets du Benoxacor seul et ceux du mélange atrazine et Benoxacor (Tableau 6.5.3.).

Un effet remarquable est une baisse de la valeur du  $F_M$  : 902 pour le témoin, 222 pour les échantillons traités au Benoxacor seul et 264 pour les échantillons traités au Benoxacor et à l'Aatrex simultanément (données non présentées). Le  $F_M$  diminue en présence de Benoxacor mais récupère quelque peu en présence d'Aatrex. On note la même chose au sujet du  $F_o$ , soit une diminution en présence de Benoxacor puis une légère récupération en présence d'Aatrex. Le Benoxacor est la substance qui affecte le plus les paramètres photosynthétiques et la présence d'atrazine semble, en fait, interférer quelque peu. Le méthanol dans lequel le Benoxacor a été dissous n'a pas d'effet sur les paramètres  $F_o$  et  $F_M$ .

$\Phi'_M$  est très diminué avec le traitement au Benoxacor et le mélange Aatrex et Benoxacor (Tableau 6.5.3.). Le  $q_{Prel}$  diminue aussi beaucoup tandis que  $q_{Nrel}$  augmente légèrement ainsi que  $q_N$ .  $UQF_{rel}$  augmente fortement et NPQ, fait intéressant, baisse passablement. On aurait pu s'attendre à ce que la tendance du paramètre NPQ suivrait celles des paramètres  $q_{Nrel}$  et  $q_N$  mais le calcul des paramètres  $q_N$  et  $q_{Nrel}$  utilisant le  $F_o$ , ce qui n'est pas le cas du NPQ, les calculs peuvent diverger considérablement à cause de l'effet de la substance Benoxacor sur  $F_o$ .

Tableau 6.5.3. Effets du Benoxacor seul (2% (p/p)) et avec 0,1  $\mu$ M d'Aatrex sur les voies de dissipation de l'énergie chez UTCC 299 exposée pendant 96 heures. B signifie Benoxacor et AA l'Aatrex. É-t signifie écart-type.

BENOXACOR								
299		$\Phi'_M$	$q_{Prel}$	$q_{Nrel}$	$q_P$	$q_N$	UQFrel	NPQ
Témoin 96 h	moy	0,516	0,696	0,258	0,938	0,257	0,046	0,191
	É-t	0,004	0,017	0,016	0,003	0,013	0,001	0,015
B 2%	moy	0,041*	0,246*	0,301	0,351*	0,313	0,454*	0,051*
	É-t	0,002	0,013	0,041	0,005	0,051	0,028	0,008
0,1 $\mu$ M AA+B 2%	moy	0,052*	0,298*	0,282*	0,415*	0,322*	0,420*	0,049*
	É-t	0,002	0,008	0,013	0,017	0,029	0,020	0,004
Variations								
B 2%	%	-92	-65	+16	-63	+22	+870	-73
0,1 $\mu$ M AA+B 2%	%	-90	-57	+9	-56	+26	+813	-74

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

#### 6.5.4. PEA

La valeur du paramètre (ABS/RC) est fortement augmentée en présence de Benoxacor et du mélange Benoxacor/atrazine (Tableau 6.5.4.). La taille de l'antenne efficace ( $\bar{ABS}/\bar{RC}$ ) et qui est représentée par le nombre total de photons absorbés par les molécules de chlorophylle de tous les centres réactionnels divisés par le nombre total de centres réactionnels actifs. La valeur peut être influencée par le ratio des centres réactionnels actifs/inactifs. (Force *et al.*, 2003). La taille de l'antenne augmente considérablement avec la présence de Benoxacor à 96 heures; avec ou sans atrazine dans le milieu. On se rappellera une récupération de ce paramètre lors des tests faits avec le Primextra II magnum à 96 heures. Si on se fie à la définition de  $\bar{ABS}/\bar{RC}$ , les photons absorbés par l'antenne qui sont reconduits aux molécules des centres réactionnels sont divisés entre tous les centres réactionnels actifs. Une hausse de la valeur  $\bar{ARS}/\bar{RC}$  signifierait qu'il y aurait plus de photons par centres réactionnels actifs. Soit l'antenne grossirait, ce qui ne

semblerait pas le cas, soit le nombre de centres réactionnels actifs qui peuvent contribuer à l'absorption est à la baisse, et par le fait même la quantité de chlorophylle. Le paramètre étant affecté par le ratio actif : inactif, on peut croire que le nombre de centres réactionnels inactifs est à la hausse et les centres réactionnels actifs restants se partageraient l'énergie. Les RC/ABS et le RC/CS à la baisse montrent bien que le nombre de centres réactionnels actifs et contribuant à l'absorbance totale est plus faible, ce qui peut indiquer une baisse de la chlorophylle.

Le transport des électrons (Eto/RC) est favorisé par le Benoxacor mais inhibé en présence d'Aatrex. Le TRo/RC augmente avec le Benoxacor seul et revient au niveau du témoin avec l'ajout d'Aatrex. L'atrazine induit un blocage du transport des électrons mais le Benoxacor aurait un effet à l'encontre de l'atrazine. Cette réoxydation favorisée par la présence de Benoxacor pourrait provenir d'une redirection des électrons vers une voie alterne.

La dissipation d'un centre réactionnel (Dio/RC) est représentée par le ratio de la dissipation totale de l'énergie d'excitation non trappée divisée par tous les centres réactionnels actifs. Cette dissipation peut être de la chaleur, de la fluorescence ou un transfert vers d'autres systèmes (Force *et al.*, 2003). Comme dans le cas de ABS/RC, le ratio de centres réactionnels actifs et inactifs peut influencer cette valeur. La dissipation est très fortement favorisée en présence de Benoxacor seul et le reste même s'il y a présence d'atrazine. Ce dernier affecterait surtout les pigments et serait impliqué dans la formation des espèces réactives oxygénées. Le Benoxacor semble avoir un effet sur une des composantes de NPQ, cette composante pouvant être  $q_T$ . Les effets des deux substances semblent être additifs.

Il est difficile de mesurer la cinétique de fluorescence rapide chez les cyanobactéries car le PSI et les phycobilines contribuent beaucoup à la fluorescence non variable mais pas à la fluorescence variable (Fork et Mohanty, 1986). Hiraki *et al.*, (2003) affirment que le niveau P qui devrait correspondre au  $F_M$  est plus bas qu'il ne le serait car la haute activité du PSI tire les électrons du «pool» du plastoquinone, ce qui peut avoir une incidence sur les calculs des paramètres biophysiques. De plus, une partie du flux électronique est déviée vers la chaîne respiratoire.

Tableau 6.5.4. Effets du Benoxacor seul (2% (p/p)) et avec 0,1  $\mu$ M d'Aatrex sur les paramètres biophysiques de UTCC 299 exposée pendant 96 heures. B signifie Benoxacor et AA est l'Aatrex.

BENOXACOR							
299	ABS/RC	ETo/RC	TRo/RC	Dio/RC	RC/CS	RC/ABS	
96 h							
Témoin 96 h	8,061	1,763	3,314	-4,747	0,211	0,124	
Écart-type	0,082	0,019	0,020	0,073	0,003	0,001	
B 2%	30,857*	2,143*	4,083*	-26,774*	0,037*	0,032*	
Écart-type	0,553	0,065	0,102	0,482	0,001	0,001	
0,1 $\mu$ M AA + B 2%	30,542*	0,883*	3,355	-27,187*	0,037*	0,033*	
Écart-type	1,983	0,050	0,123	1,861	0,002	0,002	
Variations							
B 2%	%	+283	+22	+23	+464	-82	-74
0,1 $\mu$ M AA + B 2%	%	+279	-50	+1	+473	-82	-73

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

#### 6.5.5. Analyse condensée.

Rares sont les études faites sur les effets du Benoxacor sur les algues ou les cyanobactéries. Il semblerait que, selon Day et Hodges (1996) certaines cyanobactéries ne soient pas sensibles au Benoxacor. Les études ne portaient que sur l'inhibition de la croissance de la cyanobactérie *Anabaena cylindrica* et de l'algue verte *Selenastrum capricornutum*. Ils déterminèrent un effet négatif certain sur la croissance de l'algue verte mais pas d'effet notable sur celle des cyanobactéries. L'étude en question porte sur les effets du Benoxacor seul sur la croissance de ces espèces mais pas les interactions possibles avec d'autres substances. Nous avons montré que la présence du Benoxacor influe beaucoup sur les paramètres des *quenchings* non-photochimiques et sur les paramètres biophysiques liés aux antennes. Une explication à tous ces effets peut être que le Benoxacor induise un changement de structure ou de configuration des antennes, ce qui permet de capter moins d'énergie, d'où la hausse marquée de la ré-émission de

l'énergie sous forme de fluorescence. La récupération remarquée dans les *quenchings* non-photochimiques ne semble pas être le fait de la composante  $q_E$  (chaleur) qui n'est pas présente chez les cyanobactéries. Le transfert antennaire semblerait être la composante principale impliquée dans les *quenchings*.

On peut tirer une conclusion à partir des résultats vus dans les sections 6.4 et 6.5; la présence de l'atrazine est un facteur important de la toxicité mais la présence simultanée des deux substances augmente les effets délétères. Le Benoxacor en faisant diminuer le volume de la cellule et en augmentant la surface spécifique favoriserait l'absorption (uptake) de l'atrazine le rendant plus toxique. On pourrait ici parler d'additivité. De plus, les effets du Benoxacor sont plus lents à se déclarer lorsque comparés à ceux de l'atrazine. Par ailleurs, les effets semblent se trouver principalement au niveau des systèmes antennaire et chlorophyllien.



## CHAPITRE VII

### VII. RÉSULTATS ET DISCUSSION : UTCC 632

#### 7.1. AATREX.

##### 7.1.1. Croissance.

On note une légère baisse de la croissance à 0,05  $\mu\text{M}$  puis une récupération de la croissance à 96 heures chez UTCC 632 exposée à de l'Aatrex (Tableau 7.1.1.). Les effets du l'Aatrex sur la croissance ne semblent toutefois pas être très marqués et on ne pourrait tirer de conclusion définitive sur les effets de cet herbicide sur la croissance de UTCC 632.

Tableau 7.1.1. Taux de croissance, selon le comptage cellulaire, après 96 heures de UTCC 632 exposée à 0, 0,01, 0,05 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Aatrex. Les unités représentent le nombre de fois une population est doublée par jour (dble d<sup>-1</sup>).

Jours	0 $\mu\text{M}$	0,010 $\mu\text{M}$	0,050 $\mu\text{M}$	0,10 $\mu\text{M}$
4	0,396 $\pm$ 0,007	0,401 $\pm$ 0,011	0,379 $\pm$ 0,019*	0,435 $\pm$ 0,006*

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

##### 7.1.2. Contenu en chlorophylle

On note assez peu d'effets sur le contenu en chlorophylle par cellule lorsque UTCC 632 a été exposée à de l'Aatrex (Figure 7.1.1. et Annexe A.4.). Il pourrait y avoir une très légère hausse du contenu en chlorophylle à 24 heures mais le fort effet de verdissement noté chez UTCC 299 ne semble pas avoir lieu dans le cas de UTCC 632. Comme il a été dit précédemment, il y aurait une possibilité d'effet de verdissement mais celui-ci serait très mineur. À 96 heures, la quantité de chlorophylle *a* par cellule revient au niveau du témoin. On remarque une hausse du contenu en chlorophylle *a* par volume (+ 32%) chez UTCC 632 exposée à 0,1  $\mu\text{M}$  d'Aatrex pendant 96 heures (Tableau 7.1.2.). Le volume cellulaire baisse un peu à 96 heures (Tableau 7.1.3.) et cette

baisse pourrait expliquer, en partie, cette hausse de la concentration par volume cellulaire de la chlorophylle. Par contre, on ne peut parler que d'une tendance.

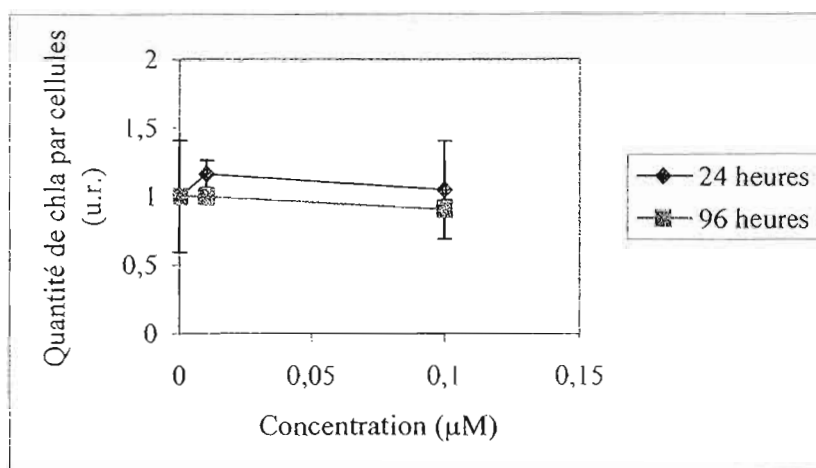


Figure 7.1.1. Quantité de chlorophylle *a* par cellules chez UTCC 632 exposée à 0, 0,01 et 0,1 μM de Aatrex pendant 24 et 96 heures.

Tableau 7.1.2. Quantité de chlorophylle *a* par volume cellulaire chez UTCC 632 exposée à 0, 0,01 et 0,1 μM de Aatrex pendant 24 et 96 heures.

632 Aatrex		24 h	96 h
0 μM	μg chl <i>a</i> /μm <sup>3</sup>	0,00147	0,00591
	Écart-type	0,00010	0,00149
0,01 μM	μg chl <i>a</i> /μm <sup>3</sup>	0,00172	0,00721
	Écart-type	0,00017	0,00017
0,1 μM	μg chl <i>a</i> /μm <sup>3</sup>	0,00146	0,00781
	Écart-type	0,00015	0,00060

### 7.1.3. Volume cellulaire et granulosité.

On ne note pas beaucoup de variation du volume et de la granulosité cellulaire (Figures 7.1.2 et 7.1.3.) lors de l'exposition de UTCC 632 à l'Aatrex. Une très légère baisse concentration-

dépendante de la granulosité est constatée à 96 heures. On remarque bien que la concentration par cellule en chlorophylle revient à la normale à 96 heures et on pourrait expliquer cette très légère baisse de la granulosité à une faible dégradation de la chlorophylle *a*. Il est par contre plus probable que la dégradation soit au niveau des extrémités des bras des phycobilisomes qui sont les premiers éléments à être dégradés (Collier et Grossman, 1992) ou bien encore, qu'il y ait dégradation des granules de cyanophycine (Miller et Holt, 1977).

Tableau 7.1.3. Volume cellulaire de UTCC 632 exposée à 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Aatrex pendant 24 heures et 96 heures.

Traitement	Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	
	24 heures	96 heures
Témoins	35,87	34,71
Écart-type	$\pm 0,39$	$\pm 1,10$
0,1 $\mu\text{M}$	39,23	32,14*
Écart-type	$\pm 2,28$	$\pm 0,42$

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

#### 7.1.4. Espèces réactives oxygénées.

L'Aatrex n'induit pas de ERO chez UTCC 632 sauf à la concentration la plus élevée (0,1  $\mu\text{M}$ ) à 24 heures (Figure 7.1.4.). Par la suite, le niveau de ERO revient à la normale. Les concentrations élevées d'Aatrex peuvent induire une production de ERO (Rutherford et Krieger-Liszkay, 2001). Il pourrait y avoir une relation entre la quantité de chlorophylle dans les cellules et la formation des espèces réactives oxygénées (données non montrées) mais la relation est nettement moins définie que dans le cas de UTCC 299.

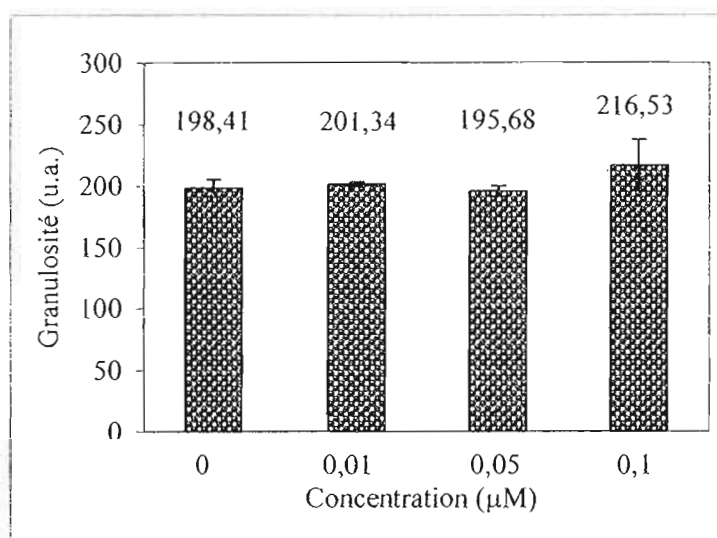
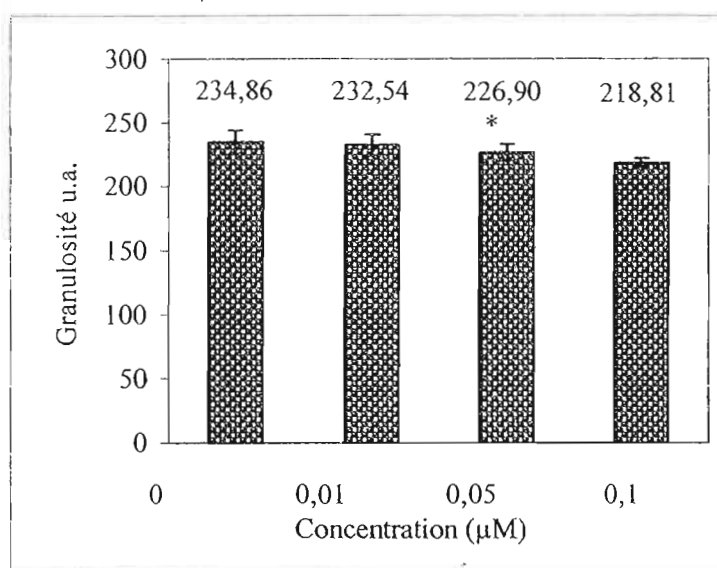
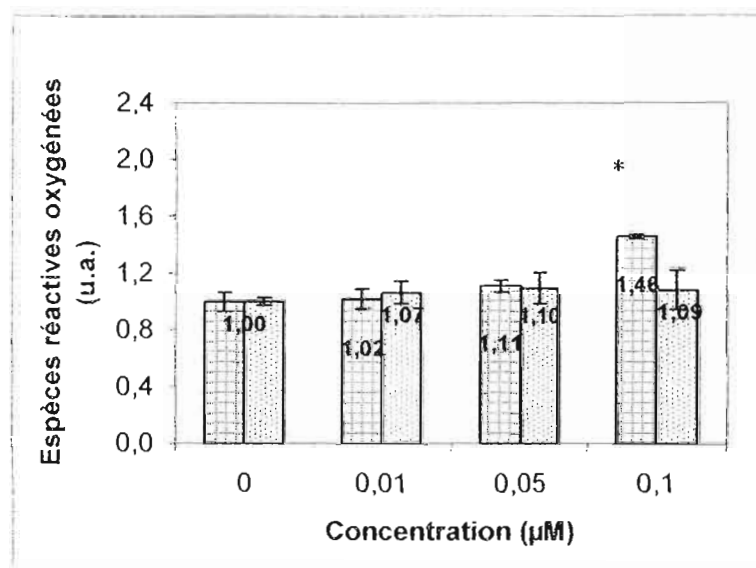


Figure 7.1.2. Granulosité des cellules de *Microcystis* UTCC 632 exposée pendant 24 heures à 0, 0,01, 0,05 et 0,1 µM d'Aatrex.





\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

Figure 7.1.3. Granulosité des cellules de *Microcystis* UTCC 632 exposée pendant 96 heures à 0, 0,01, 0,05 et 0,1 µM d'Aatrex.



\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

Figure 7.1.4. Formation d'espèces réactives oxygénées chez UTCC 632 exposée à 0, 0,01, 0,05 et 0,1 µM de Aatrex pendant 24 heures et 96 heures et mesurée au FACScan grâce à la sonde DCFH-DA (2'-7'-dichlorofluoresceine diacétate). Excitation à 488 nm et l'émission à 525 nm. La détection des ERO se fait en FL-1. Les valeurs sont arbitraires.  
24 heures  et 96 heures .

#### 7.1.5. PAM.

Ce qu'on remarque surtout est la hausse du niveau  $F_s$  lorsque UTCC 632 est exposée à de l'Aatrex pendant 96 heures (Figure 7.1.5.). Par contre, cette hausse est nettement moins élevée que dans tous les cas vus précédemment avec UTCC 299, que ce soit avec le Primextra II magnum ou l'Aatrex.

Le paramètre  $\Phi'_M$  (efficacité opérationnelle) subit une baisse de 23% à 96 heures (Tableau 7.1.4.). On remarque de légères baisses du transport des électrons à 24 heures ainsi qu'à 96 heures mais significatives ( $q_{prel}$  -11% et  $q_p$  -22%) et une forte baisse de la dissipation non-photochimique ( $q_{Nrel}$  -46% et  $q_N$  -25%) à 96 heures. On observe une augmentation du  $UQF_{rel}$  de UTCC 632 de 357% à 96 heures mais la hausse est moins forte que celle de UTCC 299 (+495%). Ici aussi, on note un effet moins marqué de l'herbicide sur la photosynthèse de UTCC

632 lorsque l'on compare avec UTCC 299. NPQ est fortement inhibé à 96 heures (baisse de 52%).

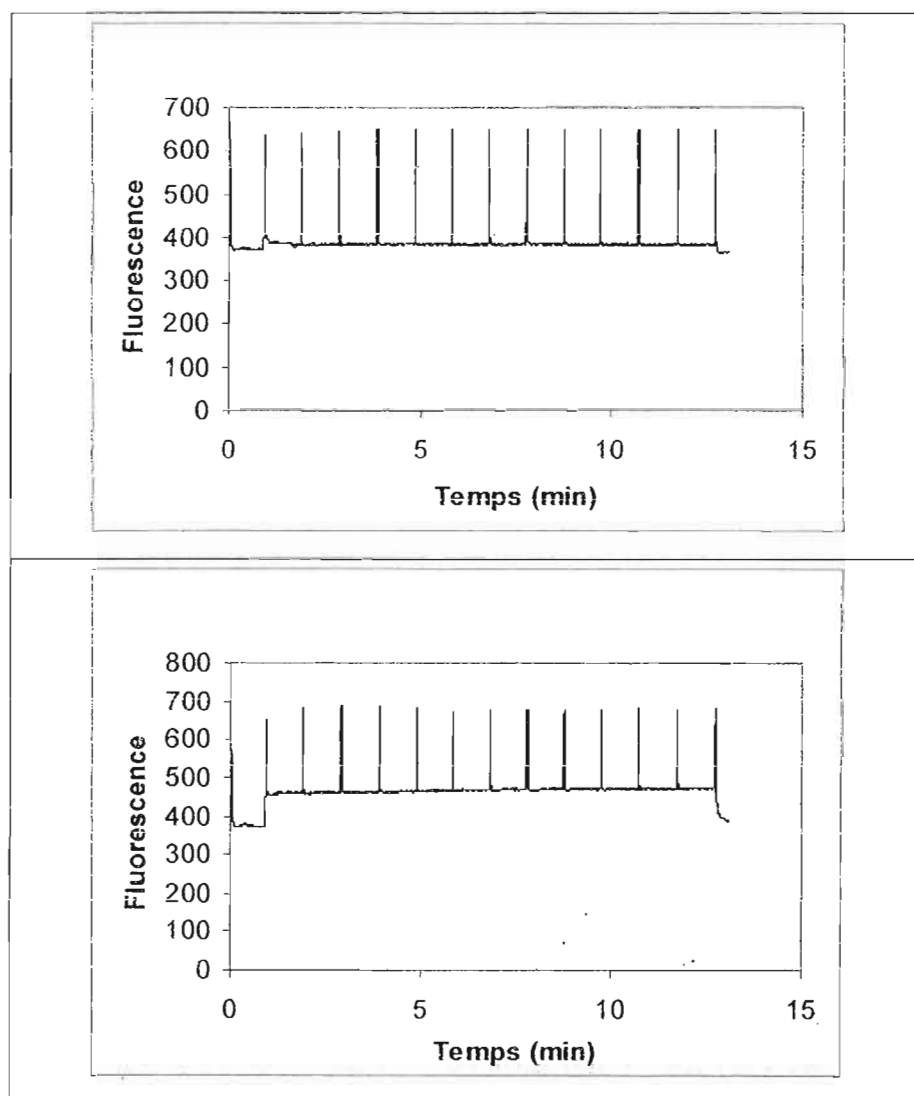


Figure 7.1.5. Cinétique de fluorescence obtenue au PAM pour UTCC 632 exposée et à  $0,1\mu\text{M}$  d'Aatrex pendant 96 heures.

Tableau 7.1.4. Effets de l'Aatrex sur les diverses voies de dissipation de l'énergie de UTCC 632 exposée pendant 24 heures et 96 heures. É-t signifie écart-type.

AATREX								
632		$\Phi'_M$	$q_{Prel}$	$q_{Nrel}$	$q_P$	$q_N$	UQFrel	NPQ
Témoin 24 h	moy	0,419	0,739	0,194	0,917	0,190	0,067	0,110
	É-t	0,004	0,012	0,011	0,003	0,009	0,002	0,009
0,1 $\mu$ M 24 h	moy	0,353*	0,638*	0,135	0,737*	0,194	0,227*	0,075
	É-t	0,003	0,008	0,013	0,001	0,015	0,004	0,009
Variation vs tém 24 h		-16%	-14%	-30%	-20%	+2%	+239%	-32%
Témoin 96 h	moy	0,442	0,706	0,241	0,930	0,240	0,053	0,152
	É-t	0,001	0,017	0,014	0,005	0,014	0,003	0,012
0,1 $\mu$ M 96 h	moy	0,339*	0,627*	0,131	0,722*	0,179	0,242*	0,071
	É-t	0,007	0,024	0,017	0,014	0,013	0,007	0,010
Variation vs tém 96 h		-23%	-11%	-46%	-22%	-25%	+357%	-52%

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

#### 7.1.6. PEA

À 24 heures, la grosseur des antennes (ABS/RC) diminue (-13 %) puis continue à diminuer jusqu'à 96 heures (-15 %) (Tableau 7.1.5.). Le transport des électrons dans le PSII (ETo/RC) est inhibé et est diminué de 59 % par rapport au témoin tandis que la dissipation sous forme de chaleur (DIO/RC) est diminuée de 17 % à 96 heures.

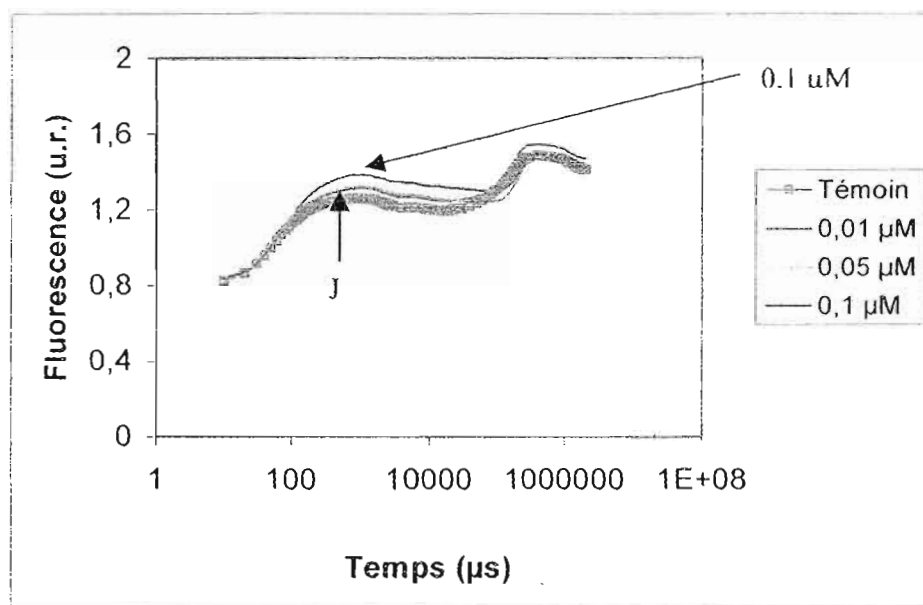


Figure 7.1.6. Courbe de cinétique rapide obtenue au PEA pour UTCC 632 exposée à 0,1  $\mu\text{M}$  de Aatrex pendant 96 heures. La courbe en gras est le témoin. On remarque peu de hausse du niveau J.

La captation ou «trapping» des électrons (Tro/RC) dans la chaîne de transport linéaire des électrons diminue à 96 heures de 11 %. Les valeurs des paramètres RC/ABS (centres réactionnels actifs participant à l'absorbance totale) et RC/CS (centres réactionnels actifs par section transversale du PSII) augmentent légèrement mais la hausse est nettement moins marquée que dans le cas de UTCC 299. On peut penser que la hausse de la valeur de ces paramètres est moindre à cause d'une baisse de la taille des antennes et d'une faible variation du contenu en chlorophylle. Le blocage créé par l'herbicide peut créer une légère sur-excitation par les électrons des centres réactionnels du PSII mais comme la captation d'énergie par les antennes est moindre du fait de la baisse de leur taille, cette sur-excitation est relativement faible. Comme il n'y a pas de réel effet de verdissement, le niveau de chlorophylle dans les cellules est stable, ce qui limite la sur-excitation des centres réactionnels qui serait causée par le blocage. La quantité de chlorophylle par cellule revenant au niveau du témoin à 96 heures et la taille des antennes baissant, l'excitation des centres réactionnels est moins forte que dans le cas de UTCC 299 malgré le fait d'un blocage du transport des électrons (Figure 7.1.5.).



Tableau 7.1.5. Effets de l'Aatrex sur les paramètres biophysiques de UTCC 632 exposé pendant 24 heures et 96 heures. É-t signifie écart-type.

AATREX							
632		ABS/RC	ETo/RC	TRo/RC	DIo/RC	RC/CS	RC/ABS
Témoin 24 h	moy	11,408	1,864	3,927	-7,481	0,134	0,088
	É-t	0,484	0,056	0,009	0,475	0,009	0,004
0,1 µM 24 h	moy	9,904*	0,739*	3,542*	-6,362*	0,158*	0,101*
	É-t	0,422	0,136	0,042	0,381	0,010	0,004
Variation vs tém 24 h		-13%	-60%	-10%	-15%	+18%	+15%
Témoin 96 h	moy	11,774	1,989	3,867	-7,907	0,129	0,086
	É-t	1,002	0,074	0,139	0,863	0,014	0,007
0,1 µM 96 h	moy	10,050	0,808*	3,450*	-6,601	0,153	0,100
	É-t	0,597	0,111	0,106	0,504	0,012	0,006
Variation vs tém 96 h		-15%	-59%	-11%	-17%	+19%	+17%

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

#### 7.1.7. Analyse condensée.

Les pigments ne sont pas dégradés de façon marquée et la croissance n'est pas affectée par la présence de l'Aatrex. Il ne semble pas qu'il y ait un effet de verdissement marqué à 24 heures, d'où le peu de ERO formées. La stabilité du contenu cellulaire en pigments de UTCC 632 semble la protéger car une hausse du contenu cellulaire en chlorophylle aurait pu permettre une formation accrue de ERO comme ce fut le cas avec UTCC 299. Il semble donc qu'aux concentrations testées la souche non-toxique soit plus résistante que la souche toxique à l'herbicide Aatrex.

## 7.2. DUAL MAGNUM ET DUAL II MAGNUM.

### 7.2.1. Croissance.

On ne note pas d'effets délétères sur la croissance de UTCC 632 exposée aux deux herbicides (Tableau 7.2.1.). Il pourrait même y avoir un très léger effet stimulant à la concentration de 0,1  $\mu\text{M}$  après 96 heures lors de l'exposition de la souche non-toxique au Dual. Le taux de croissance est significativement différent du témoin lorsque UTCC 632 est exposée à 0,05  $\mu\text{M}$  et 0,1  $\mu\text{M}$  de Dual II magnum. Par contre, les écarts des taux de croissance entre les échantillons traités et le témoin sont très faibles et on ne peut être réellement affirmatif quant à cet effet stimulant. Tout au plus, peut-on parler de tendance.

Tableau 7.2.1. Croissance de UTCC 632 exposée à 0, 0,05 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Dual magnum et Dual II magnum pendant 4 jours. Les unités représentent le nombre de fois une population est doublée par jour (dble  $\text{d}^{-1}$ ).

Jours	Herbicide	0 $\mu\text{M}$	0,05 $\mu\text{M}$	0,10 $\mu\text{M}$
4	Dual magnum	0,364 $\pm$ 0,011	0,377 $\pm$ 0,007	*0,382 $\pm$ 0,006
4	Dual II magnum	0,364 $\pm$ 0,011	*0,399 $\pm$ 0,014	*0,390 $\pm$ 0,011

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

### 7.2.2. PAM

Les paramètres liés à la dissipation non-photochimique ( $q_N$  et NPQ) sont affectés par ces herbicides et leurs valeurs augmentent lors de l'exposition de UTCC 632 au métolachlore (Tableau 7.2.2.). On remarque cette hausse tout particulièrement lors du traitement au Dual sans Benoxacor. À 24 heures, NPQ monte de 20 % par rapport au témoin. Les électrons pourraient être redistribués au PSI grâce au transport antennaire ce qui expliquerait la hausse des paramètres non-photochimiques qui seraient plus efficaces. Ces procédés de dissipation de l'énergie seraient particulièrement actifs et pourraient permettre le désengorgement du PSII. Un changement dans la conformation de l'antenne est une hypothèse à envisager. Le paramètre  $UQF_{rel}$  baisse légèrement ce qui semblerait indiquer une oxydation du PSII. Les électrons

n'engorgeraient pas le PSII et sembleraient pouvoir continuer à circuler, ce qui pourrait aussi être dû à un quelconque transport alternatif tel le transport cyclique.

Tableau 7.2.2. Effets de 0,1  $\mu\text{M}$  de Dual magnum (sans Benoxacor) et de Dual II magnum (avec Benoxacor) sur les diverses voies de dissipation de l'énergie de UTCC 632 exposée pendant 96 heures. La concentration de Benoxacor dans le Dual II magnum est de 4% (p/p). É-t signifie écart-type.

DUAL MAGNUM								
632		$\Phi'_M$	$q_{\text{Prel}}$	$q_{\text{Nrel}}$	$q_P$	$q_N$	$UQ_{\text{Frel}}$	NPQ
Témoin 96 h	moy	0,424	0,666	0,284	0,930	0,286	0,050	0,181
	É-t	0,003	0,004	0,007	0,003	0,007	0,003	0,006
0,1 $\mu\text{M}$	moy	0,426	0,639	0,322	0,942*	0,334	0,039	0,217
	É-t	0,003	0,039	0,042	0,002	0,038	0,003	0,038
Variation vs tém	%	0	-4	+13	+1	+17	-27	+20
DUAL II MAGNUM								
Témoin 96 h	moy	0,424	0,666	0,284	0,930	0,286	0,050	0,181
	É-t	0,003	0,004	0,007	0,003	0,007	0,003	0,006
0,1 $\mu\text{M}$	moy	0,431	0,654	0,305	0,941*	0,313	0,041*	0,206
	É-t	0,002	0,005	0,007	0,006	0,017	0,004	0,006
Variation vs tém	%	0	-2	+7	+2	+9	-18	+14

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

### 7.2.3. PEA.

On note quelques effets sur les paramètres biophysiques de UTCC 632 mais relativement faibles (Tableau 7.2.3.). Les écarts entre les valeurs des paramètres des témoins et des échantillons traités avec 0,1  $\mu\text{M}$  de Dual et Dual II magnum sont très faibles. Les paramètres les plus intéressants sont ceux liés à l'état des antennes (ABS/RC), qui sont très légèrement affectés à la baisse, et ceux liés à la capacité des centres réactionnels à capter l'énergie lumineuse (RC/ABS et RC/CS). On peut conclure que le métolachlore ne présente pas d'effets délétères très marqués sur la photosynthèse de la souche de *Microcystis aeruginosa* non-toxique (UTCC 632) mais ils sont toutefois plus notables que sur celle de UTCC 299.

Tableau 7.2.3. Effets de 0,1  $\mu\text{M}$  de Dual magnum (sans Benoxacor) et de Dual II magnum (avec Benoxacor) sur les paramètres biophysiques de UTCC 632 exposée pendant 96 heures. La concentration de Benoxacor dans le Dual II magnum est de 4% (p/p). É-t signifie écart-type.

DUAL MAGNUM							
632		ABS/RC	ETo/RC	TRo/RC	DIo/RC	RC/CS	RC/ABS
Témoin 96 h	moy	11,767	1,864	3,908	-7,859	0,128	0,085
	É-t	0,450	0,027	0,056	0,438	0,007	0,003
0,1 $\mu\text{M}$	moy	10,509*	1,647*	3,657*	-6,852*	0,147*	0,095*
	É-t	0,416	0,069	0,028	0,416	0,009	0,004
Variation vs tém	%	-11	-12	-6	-13	+15	+12
DUAL II MAGNUM							
Témoin 96 h	moy	11,767	1,864	3,908	-7,859	0,128	0,085
	É-t	0,450	0,027	0,056	0,438	0,007	0,003
0,1 $\mu\text{M}$	moy	10,710*	1,730*	3,660*	-7,050*	0,142*	0,093*
	É-t	0,202	0,070	0,054	0,148	0,003	0,002
Variation vs tém	%	-9	-7	-6	-10	+11	+10

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

### 7.3. PRIMEXTRA II MAGNUM.

#### 7.3.1. Croissance.

À 96 heures, la croissance cellulaire de UTCC 632 n'est pas inhibée par le Primextra II magnum et celle-ci semblerait même être légèrement stimulée aux plus hautes concentrations, 0,05  $\mu\text{M}$  et 0,1 (Tableau 7.3.1.).

Tableau 7.3.1. Taux de croissance, selon le comptage cellulaire, après 96 heures de UTCC 632 exposée à 0, 0,01, 0,05 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra II magnum. Les mesures ont été faites au Coulter Counter. Les unités représentent le nombre de fois une population est doublée par jour (dble d<sup>-1</sup>).

Jours	0 $\mu\text{M}$	0,010 $\mu\text{M}$	0,050 $\mu\text{M}$	0,10 $\mu\text{M}$
4	0,360 $\pm$ 0,003	0,379 $\pm$ 0,003	0,419 $\pm$ 0,026	*0,402 $\pm$ 0,003

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

#### 7.3.2. Contenu en chlorophylle.

On note peu d'effets marqués sur l'état de la chlorophylle chez UTCC 632 exposée au Primextra II magnum mais une légère tendance à la hausse de la quantité de chlorophylle par cellules à 24 heures (+8%) et il en est de même à 96 heures (+16% ) après exposition à 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra II magnum (Figure 7.3.1. et Annexe A.3.). Les effets sont très peu définis lorsque l'on compare avec la souche UTCC 299.

La tendance est exactement la même pour le contenu en chlorophylle par volume cellulaire (Tableau 7.3.2.), c'est-à-dire qu'on remarque une hausse du contenu en chlorophylle par volume cellulaire à 24 heures (+6%) et à 96 heures (+43%) lors d'une exposition à 0,1 $\mu\text{M}$  de Primextra II magnum. Le contenu par cellule ne varie pas vraiment mais le volume diminuant un peu à 96 heures (Tableau 7.3.3.), ceci explique la hausse de la concentration de chlorophylle par volume à 96 heures. On remarque bien que le Primextra II magnum n'affecte pas UTCC 299 et UTCC 632 de la même façon. Tandis que le Primextra affectait de façon négative la croissance de

UTCC 299 (souche toxique), UTCC 632 (souche non-toxique) ne voit pas sa croissance affectée et son contenu en chlorophylle ne baisse pas comme c'était le cas de UTCC 299.

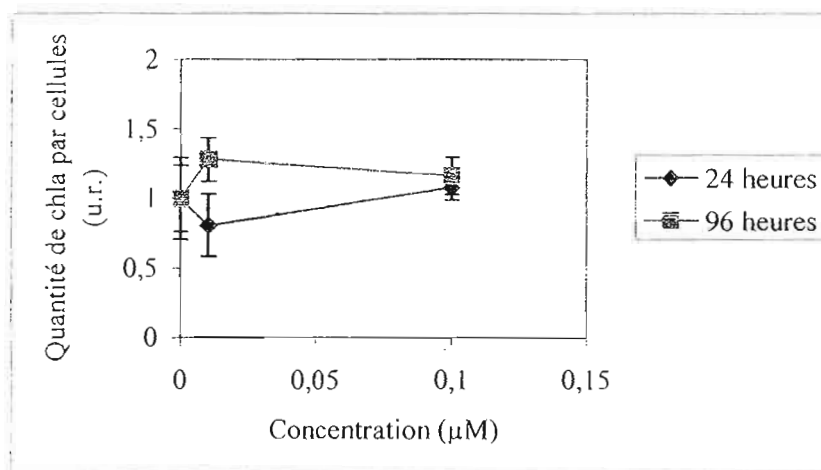


Figure. 7.3.1. Quantité de chlorophylle *a* par cellules chez UTCC 632 exposée à 0, 0,01 et 0,1 µM de Primextra II magnum pendant 24 et 96 heures. Les valeurs sont ramenées en valeurs relatives.

Tableau 7.3.2. Quantité de chlorophylle *a* par volume cellulaire chez UTCC 632 exposée à 0, 0,01 et 0,1 µM de Primextra II magnum pendant 24 et 96 heures.

632 Primextra II magnum		24 h	96 h
0 µM	µg <sub>chla</sub> /µm <sup>3</sup>	0,00176	0,00443
	Écart-type	0,00048	0,00080
0,01 µM	µg <sub>chla</sub> /µm <sup>3</sup>	0,00151	0,00590*
	Écart-type	0,00035	0,00057
0,1 µM	µg <sub>chla</sub> /µm <sup>3</sup>	0,00187	0,00634*
	Écart-type	0,00011	0,00098

\* significativement différent du témoin (P < 0,05)

### 7.3.3. Volume cellulaire et granulosité.

Le volume cellulaire ne varie pas à 24 heures (Tableau 7.3.3.) tandis qu'il semble y avoir une légère baisse du volume à 96 heures en présence de 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra II magnum. Par contre, les résultats ne sont pas vraiment significatifs. Le volume cellulaire ne semble pas varier à cause de la présence de l'herbicide.

Tableau 7.3.3. Volume cellulaire de UTCC 299 exposée à 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra II magnum pendant 24 heures et 96 heures.

Traitement	Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	
	24 heures	96 heures
Témoins	34,24	35,23
Écart-type	$\pm 0,49$	$\pm 0,83$
0,1 $\mu\text{M}$	33,33	32,06
Écart-type	$\pm 1,05$	$\pm 1,23$

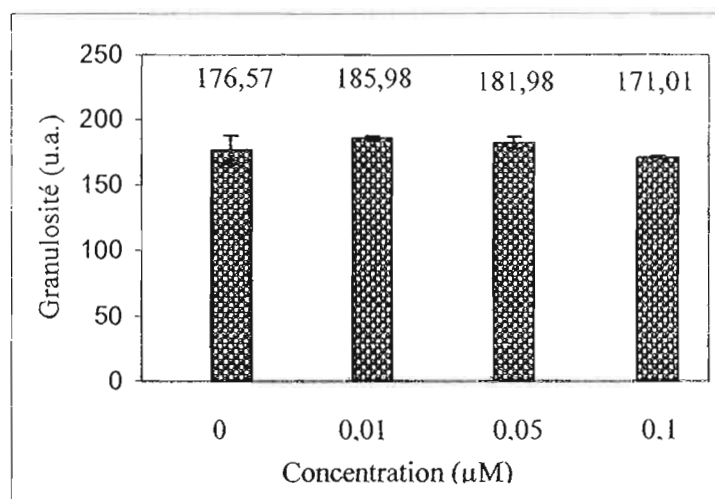
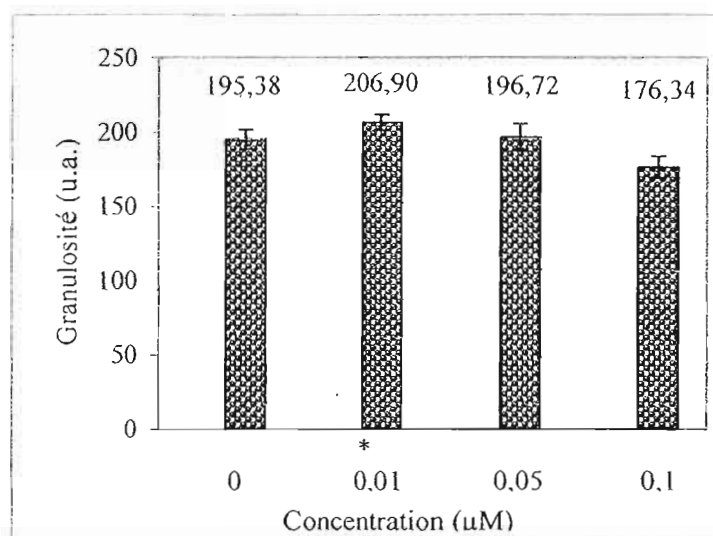


Figure 7.3.2. Granulosité des cellules de *Microcystis* UTCC 632 exposée pendant 24 heures à 0, 0,01, 0,05 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra II magnum.



\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

Figure 7.3.3. Granulosité des cellules de *Microcystis* UTCC 632 exposée pendant 96 heures à 0, 0,01, 0,05 et 0,1 µM de Primextra II magnum.

On note peu de changements au niveau de la granulosity cellulaire (Figures 7.3.2. et 7.3.3.). Il ne semble pas que l'effet de verdissement soit vraiment présent car la hausse de chlorophylle n'est pas vraiment conséquente. De plus, il ne semblerait pas que la chlorophylle ni les phycobilisomes ne soient vraiment affectés et dégradés, d'où le peu de changements au niveau de la granulosity. Il ne semble y avoir qu'un léger effet sur la granulosity à 96 heures en présence de 0,1 µM de Primextra.

#### 7.3.4. Profil pigmentaire

On remarque que UTCC 632 présente un pic très marqué au niveau de 610-620 nm, ce qui n'était pas le cas de UTCC 299. Les profils d'absorbance diffèrent entre UTCC 632 et UTCC 299, ce qui indique une composition pigmentaire légèrement différente entre les deux souches. Il ne semble pas que nous puissions détecter la phycoérythrine chez le témoin tandis qu'on note un pic au niveau de 610 nm, soit celui de la phycocyanine (Figure 7.3.4.).



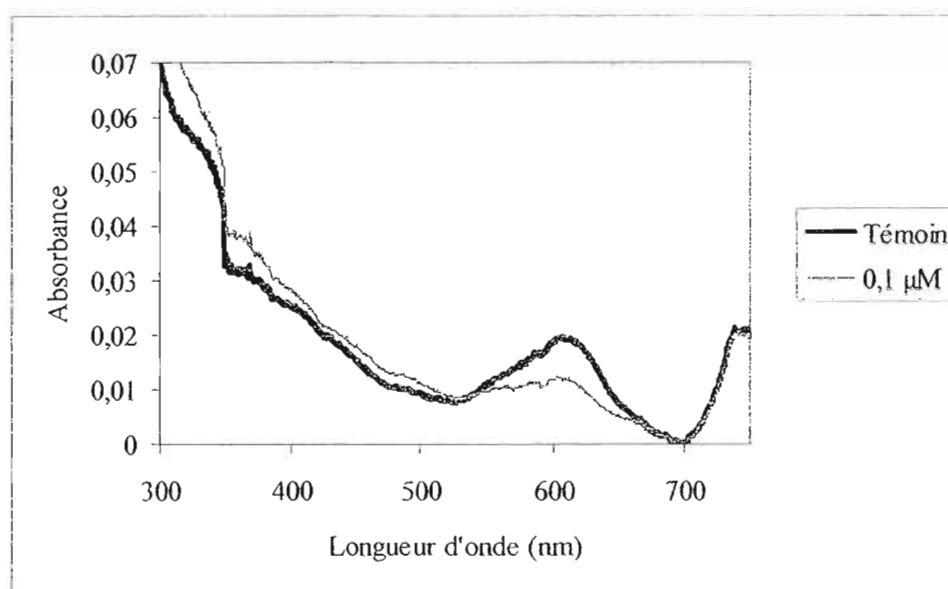


Figure 7.3.4. Profil d'absorbance des pigments de UTCC 632 pour le témoin et l'échantillon testé avec 0,1  $\mu$ M de Primextra II magnum après 96 heures. Le trait en gras est le témoin.

La principale différence entre les deux souches est la présence marquée du pic de phycocyanine chez UTCC 632 lorsque comparée avec UTCC 299. L'exposition de UTCC 632 à 0,1  $\mu$ M de Primextra II magnum semble induire une baisse des phycobiliprotéines (phycocyanine surtout) qui ne sont toutefois pas totalement éliminées.

L'exposition de UTCC 632 au Primextra II magnum amène une baisse des phycobiliprotéines mais de façon moindre que dans le cas de UTCC 299, ce qui pourrait être une manifestation de résistance et expliquer, en partie, la relative résistance de UTCC 632. Une antenne inexistante ne serait pas en mesure de se déplacer vers le PSI et d'équilibrer l'énergie lumineuse entre les deux photosystèmes.

#### 7.3.5. Espèces réactives oxygénées.

Contrairement à UTCC 299 qui avait une forte formation de ERO lorsque exposée au Primextra II magnum, UTCC 632 en produit très peu (Figure 7.3.4.). Le peu de changement au niveau du contenu en chlorophylle peut en être une cause. UTCC 299 voyait une hausse de la quantité de

chlorophylle dès 24 heures ce qui implique une plus grande captation de l'énergie lumineuse et le blocage du transport des électrons peut ainsi augmenter le risque de formation d'espèces réactives oxygénées. Si la chlorophylle varie peu, il y a donc moins de possibilité d'avoir une formation de ERO et par le fait même un moindre risque que la chlorophylle soit dégradée par la suite par ces mêmes espèces réactives oxygénées. S'il y avait transfert de l'antenne du PSII vers le PSI, le partage de l'énergie se créant entre les 2 photosystèmes permettrait aussi une protection du PSII d'où une moins grande atteinte possible à la chlorophylle et une production moindre de ERO.

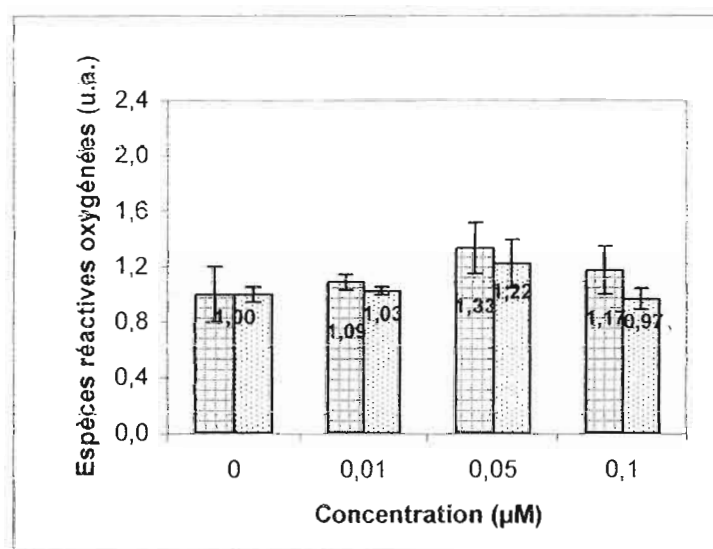




Figure. 7.3.5. Formation d'espèces réactives oxygénées chez UTCC 632 exposé à 0, 0,01, 0,05 et 0,1 μM de Primextra II magnum pendant 24 heures et 96 heures et mesurée au FACSscan grâce à la sonde DCFH-DA (2'-7'-dichlorofluoresceine diacétate). Excitation à 488 nm et l'émission à 525 nm. La détection des ERO se fait en FL-1. Les valeurs sont arbitraires. 24 heures  et 96 heures .

### 7.3.6. PAM

Ce qu'on remarque principalement c'est la hausse du niveau Fs (Figure 7.3.5.) lorsque UTCC 632 est exposée au Primextra II magnum pendant 96 heures. Cette hausse du niveau de

fluorescence indique un blocage du transport des électrons et une sur-excitation du PSII mais la hausse du Fs semble moins marquée que dans le cas de UTCC 299.

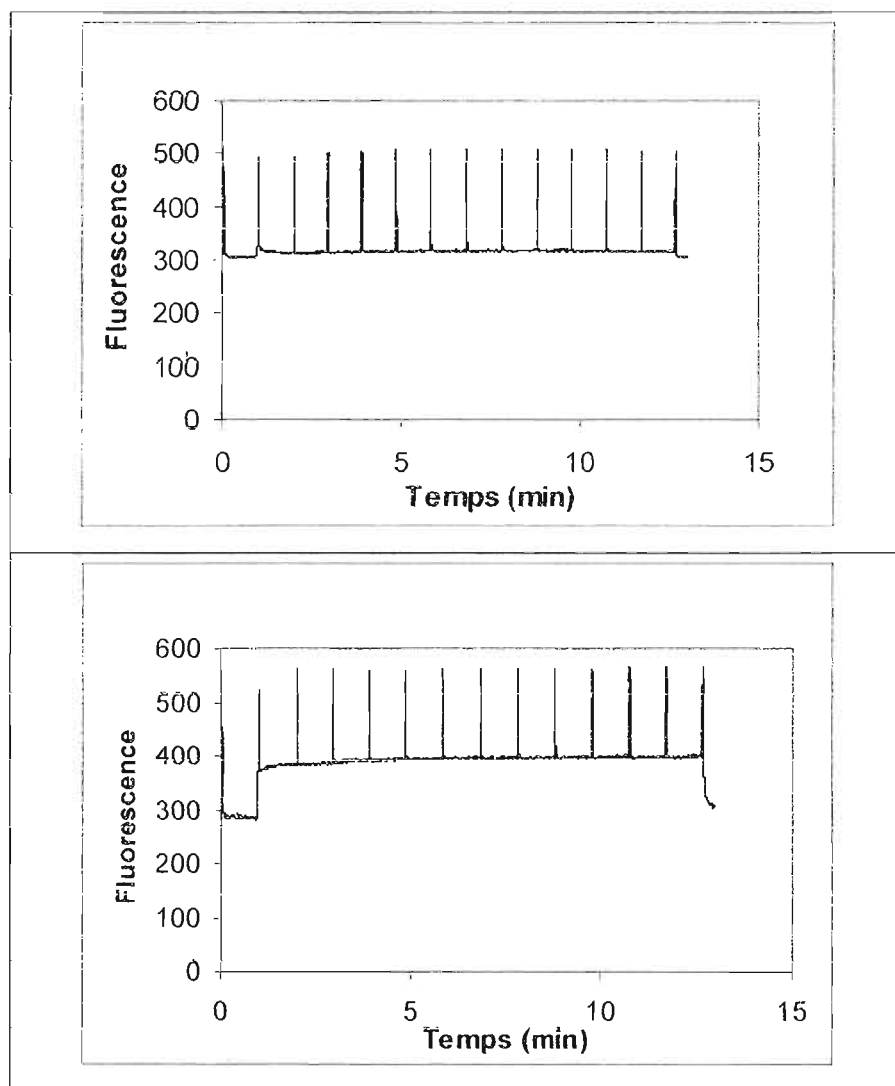


Figure. 7.3.6. Cinétique de fluorescence obtenue au PAM pour UTCC 632 exposée à 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra II magnum pendant 96 heures.

Le paramètre  $\Phi'_M$  (efficacité opérationnelle) est diminué dès 24 heures (-24%) (Tableau 7.3.4.). On remarque une baisse du transport des électrons ( $q_{\text{Pre}} -21\%$  et  $q_P -31\%$ ) à 96 heures et une baisse de la dissipation non-photochimique ( $q_{\text{Nrel}} -40\%$  et  $q_N -20\%$ ) toutefois moins marquée que dans le cas de UTCC 299.

Ce qui est très remarquable, ici aussi, est la forte hausse de  $UQF_{rel}$  ce qui indique un fort blocage du transport des électrons (Figure 7.3.6.). Nous observons le même effet avec UTCC 299 lorsque exposée au Primextra II magnum même si l'ampleur de la hausse est moindre avec UTCC 632. NPQ est fortement diminué à 24 heures (-59%) mais récupère légèrement à 96 heures (-38%) (Tableau 7.3.5.). NPQ étant composé des trois composantes  $q_E$ ,  $q_T$ , et  $q_L$ , on pourrait penser qu'une des composantes pourrait être impliquée dans cet effet récupérateur. La composante  $q_T$ , composante liée au transfert de l'antenne du PSII vers le PSI est une composante très active chez les cyanobactéries et pourrait être ce qui permettrait cette récupération.

Tableau 7.3.4. Effets du Primextra II magnum sur les diverses voies de dissipation de l'énergie de UTCC 632 exposée pendant 24 heures et 96 heures. É-t signifie écart-type.

PRIMEXTRA II MAGNUM								
632		$\Phi'_M$	$q_{PreI}$	$q_{Nrel}$	$q_P$	$q_N$	$UQF_{rel}$	NPQ
Témoin 24 h	moy	0,409	0,670	0,278	0,928	0,276	0,052	0,173
	É-t	0,010	0,054	0,054	0,007	0,057	0,004	0,041
0,1 $\mu$ M 24 h	moy	0,312*	0,577	0,130*	0,663*	0,165	0,293*	0,070*
	É-t	0,001	0,018	0,022	0,005	0,017	0,005	0,014
Variation vs tém 24 h		-24%	-14%	-53%	-29%	-40%	+463%	-59%
Témoin 96 h	moy	0,371	0,681	0,279	0,944	0,279	0,041	0,152
	É-t	0,001	0,008	0,007	0,002	0,007	0,001	0,005
0,1 $\mu$ M 96 h	moy	0,293*	0,540*	0,167	0,648*	0,222	0,293*	0,094
	É-t	0,002	0,035	0,057	0,003	0,044	0,022	0,035
Variation vs tém 96 h		-21%	-21%	-40%	-31%	-20%	+615%	-38%

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

### 7.3.7. PEA.

La taille de l'antenne de UTCC 632 est moins affectée négativement que celle de UTCC 299 à 24 heures puis elle est plus affectée que celle de la souche toxique à 96 heures. On ne note pas

de remontée des valeurs du paramètre ABS/RC comme ce fut le cas de UTCC 299. Le ABS/RC diminue à 24 heures (-19 %) et puis continue à diminuer à 96 heures (-32 %). De plus, les paramètres RC/CS et RC/ABS se démarquent moins à 24 heures, mais ils voient leurs valeurs respectives augmenter de +77 % et +62 % à 96 heures, ce qui était le contraire avec UTCC 299. La quantité de photons par centres réactionnels diminue à 24 heures car l'antenne externe semble moins en mesure de transmettre l'énergie lumineuse aux centres réactionnels. Nous avons remarqué une faible hausse de la chlorophylle à 96 heures (section 7.3.2.) qui pourrait expliquer la remontée des valeurs de RC/CS et RC/ABS car une hausse de la quantité de chlorophylle augmente les probabilités de stimuler les centres réactionnels. L'atteinte à cette antenne externe semble continuer à 96 heures car on voit toujours baisser la valeur de ABS/RC. On peut penser que l'état de l'antenne est fortement lié aux effets notés sur la photosynthèse mais celle-ci semble ne pas perdre tous ses pigments car on note toujours un léger pic au niveau des phycobilines (Figure 7.3.4). Un phycobilisome encore relativement présent et fonctionnel peut permettre à l'organisme de se protéger des dangers de photo-inhibition grâce au transfert antennaire. Comme nous remarquons une légère récupération des *quenchings* non-photochimiques à 96 heures, il est fort possible que la composante  $q_T$  soit encore efficace. La baisse du paramètre ABS/RC pourrait confirmer ce fait car son déplacement vers le PSII diminue la quantité de photons incidents atteignant les centres réactionnels du PSII, d'où la baisse de la valeur du paramètre. Il pourrait aussi y avoir une légère production de CP43' à 96 heures afin de servir d'antenne de compensation comme ceci a été expliqué précédemment dans le chapitre 6. UTCC 632 ne semble pas subir un effet de verdissement marqué à 24 heures, ce qui l'aurait protégée contre la formation de grandes quantités de EROs destructeurs. L'atteinte au transport des électrons est semblable pour les deux souches mais l'effet est plus graduel dans le cas de UTCC 632 pendant que l'effet était immédiat dès 24 heures avec UTCC 299. Il est intéressant de constater une forte baisse du transport des électrons au niveau du PSII (Eto/RC) tandis qu'il y avait une baisse relativement accessoire du transport des électrons le long de la chaîne de transport des électrons lors des tests faits au PAM ( $Q_{Prel}$ ; Tableau 7.3.4.). Il semblerait que les électrons qui sont captés par le PSII soient redirigés vers une voie alterne. Ils peuvent être redirigés vers le transport cyclique des électrons au niveau du PSI. Ils peuvent aussi se retrouver dans la chaîne respiratoire qui est liée avec le PSII. La dissipation Dfio/RC est plus affectée et inhibée chez UTCC 632.

On voit avec ces résultats que l'Aatrex a un effet moins marqué sur UTCC 632 que le mélange que constitue Primextra II magnum.

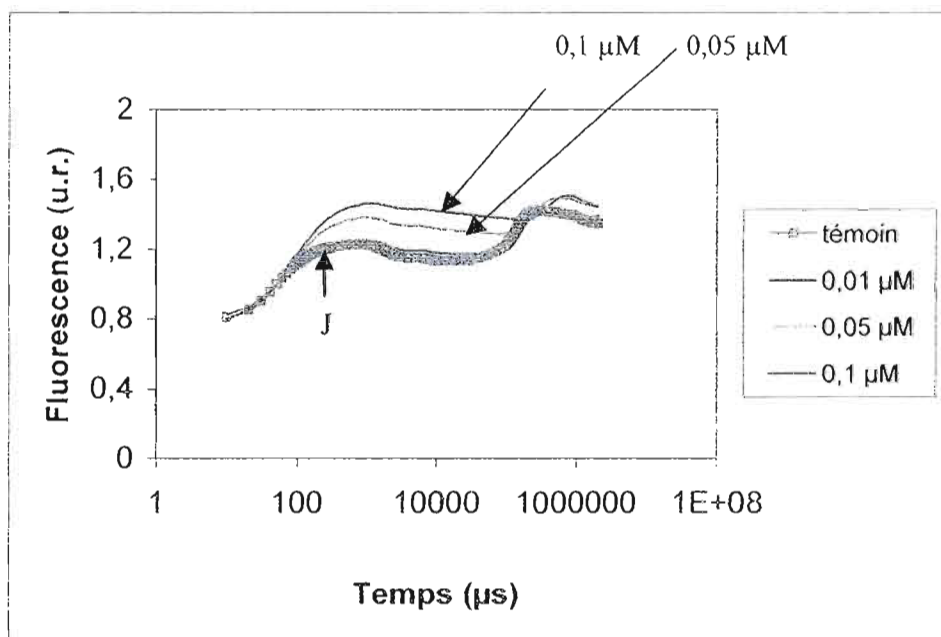


Figure. 7.3.7. Courbe de cinétique rapide obtenue au PEA pour UTCC 632 exposée à  $0,1 \mu\text{M}$  de Primextra II magnum pendant 96 heures. La courbe en gras est le témoin. On remarque une hausse du niveau J indiquant par ce fait un blocage entre  $Q_A$  et  $Q_B$ .

La composition pigmentaire peut influencer sur la sensibilité, certains pigments pouvant possiblement résister plus ou moins à la photoinhibition. Les cyanobactéries ayant de la phycoérythrine sont sensibles à la photoinhibition (Tandeau de Marsac, 1976). Plusieurs cyanobactéries ne contiennent pas de phycoérythrine mais une cyanobactérie en contenant pourrait être plus sensible à la photoinhibition. *Microcystis aeruginosa* est connue pour contenir surtout de la C-phycoyanine (Derbyshire et Whitton, 1968 ; Otsuka *et al.*, 1998), par contre, Otsuka *et al.*, (1998) montrèrent que certaines souches de *Microcystis* pouvaient contenir de la phycoérythrine. Comme il a été dit précédemment, les organismes contenant de la phycoérythrine sembleraient plus sensibles à la photo-inhibition, par extension une souche de cyanobactérie qui est plus sensible aux effets de la photo-inhibition pourrait possiblement contenir de la phycoérythrine.

Tableau 7.3.5. Effets du Primextra II magnum sur les paramètres biophysiques de UTCC 632 exposée pendant 24 heures et 96 heures. É-t signifie écart-type.

PRIMEXTRA II MAGNUM							
632		ABS/RC	ETo/RC	TRo/RC	DIo/RC	RC/CS	RC/ABS
Témoin 24 h	moy	13,347	2,113	4,203	-9,144	0,111	0,076
	É-t	1,194	0,371	0,177	1,018	0,013	0,007
0,1 µM 24 h	moy	10,781	0,566*	3,557*	-7,223	0,139	0,093
	É-t	0,261	0,064	0,024	0,243	0,005	0,002
Variation vs tém 24 h		-19%	-73%	-15%	-21%	+25%	+23%
Témoin 96 h	moy	15,005	2,526	4,476	-10,529	0,084	0,061
	É-t	0,283	0,084	0,216	0,131	0,014	0,008
0,1 µM 96 h	moy	10,161*	0,372*	3,392*	-6,769*	0,148*	0,098*
	É-t	0,018	0,003	0,017	0,001	0,000	0,000
Variation vs tém 96 h		-32%	-85%	-24%	-36%	+77%	+62%

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

Certains organismes photosynthétiques tels que les cyanobactéries peuvent s'acclimater à leur environnement lumineux en changeant leur pigmentation; c'est l'adaptation chromatique. Les cyanobactéries peuvent se classer en trois groupes au regard de ce phénomène (Tandeau de Marsac, 1977). Les cyanobactéries de classe I ne peuvent altérer la composition de leur phycobilisomes lorsqu'elles croissent dans des conditions lumineuses différentes. Les cyanobactéries de classe II ne peuvent altérer que leur composition en phycoérythrine tandis que celles de classe III peuvent moduler leur niveau de phycocyanine et de phycoérythrine. Quand les niveaux de phycocyanine et de phycoérythrine dans les phycobilisomes peuvent être modulés dans des directions opposées, on appelle ce processus adaptation chromatique complémentaire. C'est le cas des cyanobactéries de classe III. On peut facilement imaginer que ces cyanobactéries ont plus de flexibilité et ont une plus grande capacité d'adaptation et de résistance aux stress. Il est fort possible que les quantités et ratios des différents pigments

composant les phycobilisomes de UTCC 299 et UTCC 632 soient forts différents et soient une des raisons de la résistance relative de UTCC 632 versus UTCC 299. Une cyanobactérie telle que UTCC 299 peut, de par sa très grande variabilité au niveau de ses pigments, être avantagée dans la nature où les conditions lumineuses sont très changeantes. Par contre, les herbicides qui peuvent déclencher le «greening effect» qui est un mécanisme d'acclimatation peuvent aussi, de par le blocage qu'ils causent, être la cause de la formation de ERO destructeurs. Pour UTCC 632, dans les conditions de luminosité stables de la chambre de croissance, son peu de variabilité au niveau de ses pigments (pas de «greening effect» marqué) peut l'avantager. Des tests utilisant des conditions lumineuses très variées pourraient être faits afin de mimer les conditions trouvées dans le milieu aquatique.

#### 7.3.8. Analyse condensée.

UTCC 632 ne voit pas sa croissance inhibée par le Primextra II magnum comme ce fut le cas avec UTCC 299. Il ne semble pas y avoir de réel effet de verdissement lors de l'exposition de UTCC 632 à l'herbicide ni de dommages marqués aux pigments après 96 heures. Il semblerait même qu'il y ait eu une légère production de chlorophylle à 96 heures qui pourrait être un mécanisme de compensation palliant à l'atteinte faite par le mélange à l'antenne externe. Malgré tout, l'antenne semble n'avoir jamais subi une atteinte de la même envergure que celle de UTCC 299 et semble être encore capable de se déplacer pour redistribuer l'énergie entre les deux photosystèmes. Il est possible que cette antenne soit plus volumineuse ou de composition pigmentaire différente de celle de UTCC 299.

La production des espèces réactives oxygénées est très faible et semble, elle aussi, être liée à la concentration des pigments dans les cellules. Le peu de variabilité pigmentaire semble être une des raisons de la relative résistance à l'herbicide. Par contre, à long terme on ne peut savoir si cet aspect pourrait être problématique. Le NPQ récupérant après 96 heures de traitement, il semble que le *quenching* non-photochimique soit performant. Le transport cyclique au niveau du PSI peut être efficace car on ne constate pas de baisse de la croissance, ce qui indiquerait une production d'ATP continue. Les effets du Primextra II magnum sur la photosynthèse de UTCC 632 sont nettement plus marqués que ceux constatés avec l'Aatrex. Le Dual pourrait affecter



légèrement UTCC 632, ce qui pourrait augmenter les effets du mélange. Le Benoxacor pourrait aussi être un facteur impliqué dans les effets plus marqués notés avec le Primextra II magnum.

## 7.4. PRIMEXTRA RECONSTITUÉ.

### 7.4.1. Croissance.

La croissance est légèrement augmentée à 48 heures (Figure 7.4.1.) et diminuée à 96 heures (Figure 7.4.2.) par rapport au témoin lorsque du Benoxacor est ajouté au milieu. Les concentrations de Benoxacor de 2% (p/p) et de 4% (p/p) ont un effet semblable sur la croissance. À 96 heures, la croissance est diminuée de 19 % par rapport au témoin et de 16 % par rapport au Primextra reconstitué sans Benoxacor (Tableau 7.4.1.) Le Benoxacor influe négativement sur la croissance après un certain temps d'exposition. Il semble stimuler la croissance dans un premier temps puis l'inhiber par la suite. Néanmoins, la baisse de la croissance cellulaire est beaucoup moins affectée que dans le cas de UTCC 299 dans les mêmes conditions.

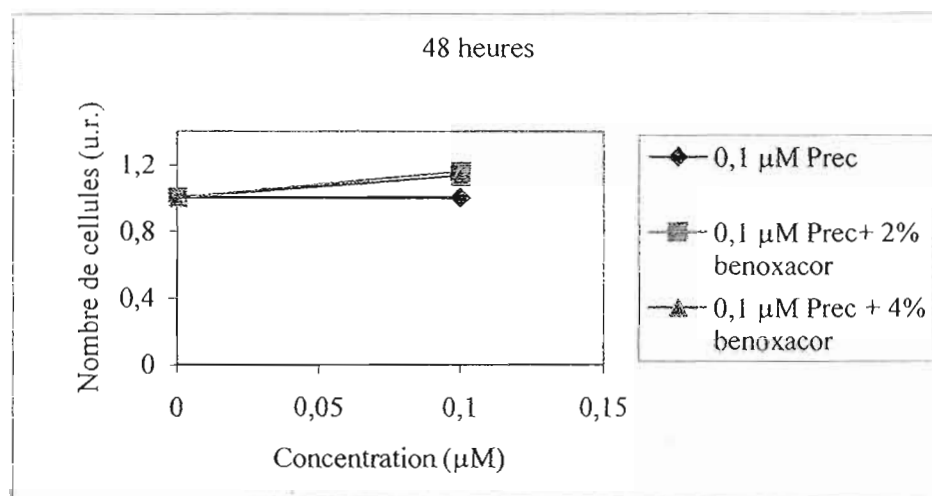


Figure 7.4.1. Courbe représentant la croissance cellulaire de UTCC 632 exposée à 0 et 0,1 µM de Primextra reconstitué sans et avec le phytoprotecteur Benoxacor après 48 heures. Les concentrations de Benoxacor testées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p). Les valeurs sont rapportées en valeurs relatives par rapport au témoin. Prec représente le primextra reconstitué.

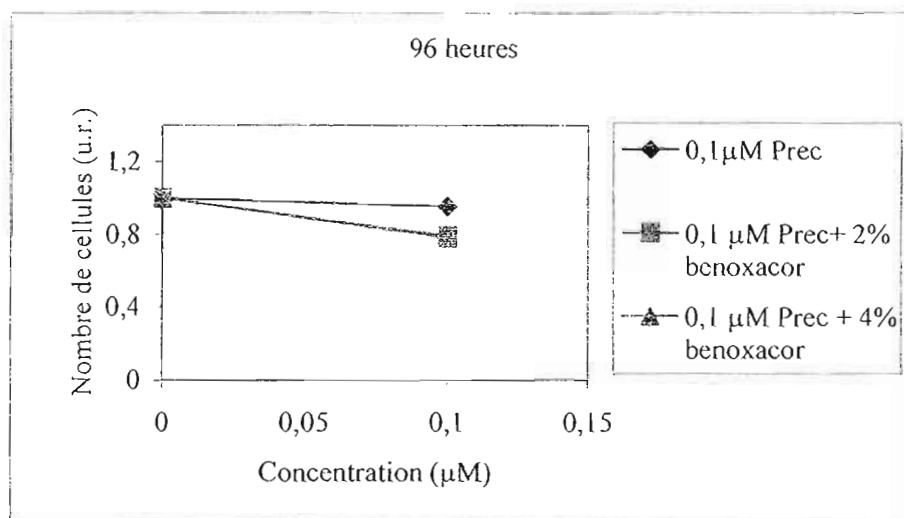


Figure 7.4.2. Courbe représentant la croissance cellulaire de UTCC 632 exposée à 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra reconstitué sans et avec le phytoprotecteur Benoxacor après 96 heures. Les concentrations de Benoxacor testées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p). Les valeurs sont rapportées en valeurs relatives par rapport au témoin. Prec représente le primextra reconstitué.

Tableau 7.4.1. Croissance de UTCC 632 exposée à 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra reconstitué sans Benoxacor, 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra reconstitué avec Benoxacor 2% (p/p) et 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra reconstitué avec Benoxacor 4% (p/p) selon le dénombrement de cellules avec le Coulter Counter Multisizer III. B signifie Benoxacor. Les unités représentent le nombre de fois une population est doublée par jour (dble  $\text{d}^{-1}$ ).

Jours	0 $\mu\text{M}$	0,10 $\mu\text{M}$	0,10 $\mu\text{M}$ + B2%	0,10 $\mu\text{M}$ + B4%
4	0,391 $\pm$ 0,009	0,381 $\pm$ 0,016	*0,332 $\pm$ 0,003	*0,337 $\pm$ 0,006

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

#### 7.4.2. Volume cellulaire.

Le volume cellulaire diminue quelque peu à 24 heures puis augmente par rapport au témoin à 96 heures (Tableau 7.4.2.). UTCC 632 semble se défendre mieux que UTCC 299 face au Benoxacor. Le volume cellulaire de UTCC 632 est moins affecté à la baisse par le Benoxacor que celui de UTCC 299. Il semblerait que la présence du Benoxacor en faisant diminuer le

volume cellulaire permette une plus grande captation de l'atrazine chez UTCC 299, ce qui augmenterait la toxicité de l'atrazine se trouvant dans le mélange. UTCC 632 en n'étant pas aussi affecté par le Benoxacor au niveau du changement de volume pourrait pour cette raison résister mieux au Primextra II magnum. En fait, à 96 heures, le volume cellulaire des cellules exposées au Benoxacor augmente légèrement, ce qui pourrait les protéger légèrement.

Weiner *et al.*, (2004) ont montré que la taille de la cellule pouvait être un facteur dans la sensibilité à l'atrazine chez différentes algues (*Isochrysis galbana*, *Dunaliella tertiolecta*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Pseudokirchneriella Subcapitata* et *Synechococcus* sp.). Ils auraient trouvé un lien entre la captation du toxique et la taille des cellules, les plus petites incorporant plus d'herbicide. Leurs résultats montrent que les cellules ayant un grand ratio surface/volume incorporaient plus d'atrazine et qu'en général étaient plus sensibles à l'atrazine.

Tableau 7.4.2. Effets de 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra reconstitué avec et sans le phytoprotecteur Benoxacor sur le volume cellulaire de UTCC 632 exposé pendant 24 et 96 heures. PR signifie Primextra reconstitué. Les concentrations de Benoxacor testées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p).

Traitement	Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	
	24 heures	96 heures
Témoins	30,84	30,54
Écart-type	$\pm 0,12$	$\pm 1,19$
0,1 $\mu\text{M}$ PR	28,14*	29,78
Écart-type	$\pm 0,25$	$\pm 0,14$
0,1 $\mu\text{M}$ PR+2%	25,94*	33,82*
Écart-type	$\pm 0,13$	$\pm 0,79$
0,1 $\mu\text{M}$ PR+4%	26,19*	33,59*
Écart-type	$\pm 0,34$	$\pm 0,18$

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

## 7.4.3. PAM

À 24 heures, on observe quelques différences dans les effets notés lors des traitements de Primextra reconstitué sans Benoxacor (PR) et avec Benoxacor sur les paramètres représentant les diverses voies de dissipation énergétique (Tableaux 7.4.3. et 7.4.4.).

Tableau 7.4.3. Effets de 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra reconstitué avec et sans le phytoprotecteur Benoxacor sur les paramètres biophysiques de UTCC 632 exposée pendant 24 et 96 heures. PR signifie Primextra reconstitué. Les concentrations de Benoxacor ajoutées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p). La ligne en grisé est la reconstitution correspondant au Primextra II magnum. É-t signifie écart-type.

RECONSTITUTION DE PRIMEXTRA II MAGNUM								
632		$\Phi'_M$	$q_{Prel}$	$q_{Nrel}$	$q_P$	$q_N$	UQFrel	NPQ
Témoin 24 h	moy	0,459	0,728	0,199	0,909	0,205	0,073	0,126
	É-t	0,005	0,009	0,009	0,006	0,013	0,005	0,006
0,1 $\mu\text{M}$ PR+0%	moy	0,328*	0,580*	0,167	0,697*	0,207	0,252*	0,095*
	É-t	0,002	0,009	0,014	0,002	0,016	0,005	0,009
0,1 $\mu\text{M}$ PR+2%	moy	0,335*	0,587*	0,188	0,724*	0,237	0,224*	0,111
	É-t	0,001	0,036	0,053	0,008	0,041	0,018	0,039
0,1 $\mu\text{M}$ PR+4%	moy	0,330*	0,608*	0,137*	0,704*	0,183	0,255*	0,074*
	É-t	0,005	0,015	0,009	0,010	0,008	0,007	0,005
Témoin 96 h	moy	0,444	0,663	0,291	0,934	0,298	0,047	0,198
	É-t	0,002	0,037	0,039	0,001	0,036	0,002	0,038
0,1 $\mu\text{M}$ PR+0%	moy	0,343*	0,595	0,185	0,730*	0,240	0,220*	0,108
	É-t	0,003	0,018	0,028	0,004	0,038	0,010	0,020
0,1 $\mu\text{M}$ PR+2%	moy	0,323*	0,563	0,204	0,707*	0,257	0,233*	0,117
	É-t	0,005	0,009	0,014	0,005	0,020	0,007	0,008
0,1 $\mu\text{M}$ PR+4%	moy	0,322*	0,564	0,205	0,709*	0,269	0,231*	0,117
	É-t	0,005	0,016	0,022	0,001	0,028	0,006	0,015

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

À 24 heures, l'effet de 2% (p/p) Benoxacor semble être celle d'une protection car le paramètre UQFrel (+207%) est plus bas par rapport au traitement Primextra sans Benoxacor (+245%). Lorsque comparé à la valeur de NPQ obtenu avec le traitement fait avec le primextra reconstitué (sans Benoxacor), NPQ récupère un peu pour le Primextra avec la concentration de

2% (p/p) Benoxacor tandis qu'à la concentration de 4% l'effet est inversé. Les  $q_N$  et  $q_{Nrel}$  sont haussés pour le PR avec 2% (p/p) par rapport au PR seul.

À 96 heures, les effets des traitements avec Benoxacor semblent être légèrement plus marqués sur  $\Phi'_M$ ,  $q_{Prel}$ ,  $q_P$  et  $UQF_{rel}$ . Les valeurs des paramètres  $\Phi'_M$ ,  $q_{Prel}$  ou  $q_P$ , baissent légèrement lorsque comparées à celles relatives au traitement de Primextra reconstitué sans Benoxacor. On note une récupération de toutes les voies de dissipations non-photochimiques telles que  $q_{Nrel}$ ,  $q_N$  et NPQ. Les valeurs du paramètre  $UQF_{rel}$  montent pour les traitements comportant du Benoxacor. Les effets du Benoxacor ne varient pas selon la concentration ajoutée. Ici aussi, on pourrait conclure que le Benoxacor a un effet sur la conformation du PSII, ce qui permettrait une légère récupération des paramètres non-photochimiques.

Tableau 7.4.4. Variation des effets de 0 et 0,1  $\mu M$  de l'herbicide reconstitué Primextra avec et sans le phytoprotecteur Benoxacor sur UTCC 632 exposée pendant 24 et 96 heures. Les valeurs sont représentées en pourcentage par rapport au témoin. PR signifie Primextra reconstitué. Les concentrations de Benoxacor ajoutées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p). La ligne en grisé est la reconstitution correspondant au Primextra II magnum. Les valeurs présentées sont calculées par rapport au témoin.

RECONSTITUTION DE PRIMEXTRA II MAGNUM								
632		$\Phi'_M$	$q_{Prel}$	$q_{Nrel}$	$q_P$	$q_N$	$UQF_{rel}$	NPQ
24 h								
0,1 $\mu M$ PR+0%	%	-29	-20	-16	-23	0	+245	-24
0,1 $\mu M$ PR+2%	%	-27	-19	-6	-20	+16	+207	-12
0,1 $\mu M$ PR+4%	%	-28	-16	-31	-22	-11	+249	-41
96 h								
0,1 $\mu M$ PR+0%	%	-23	-10	-36	-22	-19	+368	-45
0,1 $\mu M$ PR+2%	%	-38	-15	-30	-24	-14	+396	-41
0,1 $\mu M$ PR+4%	%	-38	-15	-30	-24	-10	+392	-41

#### 7.4.4. PEA

À 96 heures, la taille efficace de l'antenne (ABS/RC) diminue plus avec la présence du phytoprotecteur dans le milieu par rapport au primextra reconstitué sans Benoxacor. Le transport des électrons (Eto/RC) ainsi que Tro/RC baissent avec tous les traitements mais un peu plus encore avec la présence de Benoxacor, et ce, autant à 24 heures qu'à 96 heures. Par contre, les valeurs des paramètres RC/CS et RC/ABS ne varient pas dans tous les cas. À 24 heures, ils ne semblent pas vraiment affectés mais ils sont affectés à la baisse de façon significative à 96 heures.

À 96 heures, le primextra reconstitué (PR) avec le phytoprotecteur inhibe plus le transport des électrons (Eto/RC) et le Tro/RC que le PR seul, et ce, de manière concentration-dépendante (Tableau 7.4.5.). Les valeurs de RC/CS et RC/ABS des traitements avec Benoxacor montent très légèrement par rapport au PR seul. La capacité de Dio/RC baisse avec la concentration du phytoprotecteur dans le milieu, la concentration la plus élevée amenant la plus grande inhibition. Le ABS/RC obtenu lors des tests faits au Primextra II magnum était diminué de 19% à 24 heures et diminuait de 32 % par rapport au témoin à 96 heures. Nous observons une baisse un peu plus appuyée avec les traitements contenant du phytoprotecteur à 96 heures mais la différence est assez faible. Le traitement de primextra reconstitué avec 4 % Benoxacor semble affecter le plus les paramètres photosynthétiques.

Ce qu'on remarque surtout est l'effet du phytoprotecteur sur la taille des antennes. Un point intéressant a été remarqué ; la taille de l'antenne, et possiblement du phycobilisome, augmente en général considérablement de 24 heures à 96 heures chez UTCC 299 (Tableaux 6.1.5., 6.3.5.), ce qui n'est pas le cas chez UTCC 632. Chez UTCC 632, la taille de l'antenne peut augmenter mais l'amplitude de la hausse est assez faible (Tableau 7.1.5.). De plus, il arrive que la taille de l'antenne diminue légèrement (Tableaux 7.3.5. et 7.4.5.). Il ne semble donc pas que l'antenne grossisse autant chez UTCC 632 lorsque comparée à UTCC 299. Cette faible variation de la grosseur de l'antenne peut possiblement protéger UTCC 632 contre les effets de la photo-inhibition résultant du blocage des électrons. Le fait que les phycobilisomes pourraient augmenter beaucoup de volume chez UTCC 299 pourrait rendre l'organisme plus susceptible à la photo-inhibition causée par le blocage. La cible préférentielle des effets du Benoxacor ou de l'atrazine pourrait être l'antenne et une antenne moins volumineuse pourrait protéger l'organisme photosynthétique.



La baisse de la taille des antennes et de leur capacité de transmettre les photons aux centres réactionnels pourrait être le fait d'un déplacement de l'antenne externe vers le PSI.

Tableau 7.4.5. Effets de 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra reconstitué avec et sans le phytoprotecteur Benoxacor sur les diverses voies de dissipation de l'énergie de UTCC 632 exposée pendant 24 et 96 heures. PR signifie Primextra reconstitué. Les concentrations de Benoxacor ajoutées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p). La ligne en grisé est la reconstitution correspondant au Primextra II magnum. É-t signifie écart-type.

RECONSTITUTION DE PRIMEXTRA II MAGNUM							
632		ABS/RC	ETo/RC	TRo/RC	DIo/RC	RC/CS	RC/ABS
Témoin 24 h	moy	7,436	1,421	3,557	-3,878	0,259	0,135
	É-t	0,301	0,038	0,089	0,214	0,015	0,006
0,1 $\mu\text{M}$ PR+0%	moy	7,126	0,656*	3,359	-3,767	0,271	0,142
	É-t	0,086	0,021	0,008	0,082	0,006	0,002
0,1 $\mu\text{M}$ PR+2%	moy	7,316	0,635*	3,291*	-4,025	0,254	0,138
	É-t	0,069	0,034	0,031	0,069	0,006	0,001
0,1 $\mu\text{M}$ PR+4%	moy	6,663	0,530*	3,305	-3,358	0,281	0,145
	É-t	0,255	0,038	0,059	0,205	0,029	0,008
Témoin 96 h	moy	9,790	1,632	3,647	-6,142	0,163	0,102
	É-t	0,106	0,128	0,030	0,078	0,002	0,001
0,1 $\mu\text{M}$ PR+0%	moy	8,931*	0,779*	3,373*	-5,557*	0,180*	0,112*
	É-t	0,212	0,063	0,061	0,151	0,005	0,003
0,1 $\mu\text{M}$ PR+2%	moy	8,644*	0,692*	3,337*	-5,307*	0,189*	0,116*
	É-t	0,189	0,027	0,037	0,152	0,005	0,002
0,1 $\mu\text{M}$ PR+4%	moy	8,389*	0,519*	3,264*	-5,125*	0,196*	0,119*
	É-t	0,340	0,026	0,057	0,284	0,010	0,005

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )



Tableau 7.4.6. Variation des effets de 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  de l'herbicide reconstitué Primextra avec et sans le phytoprotecteur Benoxacor sur UTCC 632 exposée pendant 24 et 96 heures. Les valeurs sont représentées en pourcentage par rapport au témoin. PR signifie Primextra reconstitué. Les concentrations de Benoxacor ajoutées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p). La ligne en grisé est la reconstitution correspondant au Primextra II magnum.

RECONSTITUTION DE PRIMEXTRA II MAGNUM							
632		ABS/RC	ETo/RC	TRo/RC	DIo/RC	RC/CS	RC/ABS
24 h							
0,1 $\mu\text{M}$ PR+0%	%	-4	-54	-6	-3	+4	+5
0,1 $\mu\text{M}$ PR+2%	%	-2	-55	-7	+4	-2	+3
0,1 $\mu\text{M}$ PR+4%	%	-10	-63	-7	-13	+9	+8
96 h							
0,1 $\mu\text{M}$ PR+0%	%	-9	-52	-8	-10	+11	+10
0,1 $\mu\text{M}$ PR+2%	%	-12	-58	-8	-14	+16	+13
0,1 $\mu\text{M}$ PR+4%	%	-14	-68	-11	-17	+20	+17

## 7.5. BENOXACOR

### 7.5.1. Croissance.

Le Benoxacor affecte négativement la croissance même lorsqu'il est ajouté seul dans le milieu. L'ajout d'Aatrex au Benoxacor (concentration de 2% (p/p)) semble amener une plus forte décroissance (Tableau 7.5.1.). La présence simultanée des deux substances affecte grandement la croissance des cellules.

Tableau 7.5.1. Détermination du taux de croissance de UTCC 632 exposée à du Benoxacor 2% (p/p) et 0,1  $\mu$ M de Aatrex plus 2% de Benoxacor (p/p) selon le dénombrement de cellules avec le Coulter Counter Multisizer III. B signifie Benoxacor et AA est l'Aatrex. Les unités représentent le nombre de fois une population est doublée par jour (dble d<sup>-1</sup>).

Jours	0 $\mu$ M	B2% + 0 $\mu$ M	0,10 $\mu$ M AA + B2%
4	0,336	0,171	-0,137

### 7.5.2. Volume cellulaire.

Le volume cellulaire diminue en présence de Benoxacor mais celui-ci revient près de la normale avec l'ajout d'Aatrex au Benoxacor. Il semble y avoir un antagonisme entre les deux substances. Une cellule plus petite incorporerait plus d'herbicide tandis qu'une cellule plus grosse capterait moins d'herbicide. Le ratio surface : volume étant diminué le toxique deviendrait moins délétère. Les cellules augmentant de volume, celles-ci deviendraient plus résistantes à l'atrazine.

### 7.5.3. PAM

$\Phi'_M$  diminue grandement avec la présence du Benoxacor dans le milieu mais un effet curieux est constaté lors de l'ajout de l'atrazine en sus dans le milieu, soit une récupération (Tableau 7.5.3.).

Tableau 7.5.2. Volumes cellulaires lorsque UTCC 632 est exposée au phytoprotecteur Benoxacor 2% (p/p) seul et conjointement à 0,1 d'Aatrex pendant 96 heures. AA représente l'aatrex et Ben est le benoxacor.

Traitement	Volume ( $\mu\text{m}^3$ )
	96heures
Témoin	31,23
Écart-type	$\pm 1,01$
Benoxacor 2% (p/p)	22,12*
Écart-type	$\pm 0,62$
0,1 $\mu\text{M}$ AA +2% (p/p) Ben	30,47 *
Écart-type	$\pm 0,73$

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

Le calcul de  $\Phi'_M$  nécessite  $F'_M$  qui est fortement affecté à la baisse par le Benoxacor. Le même phénomène est constaté pour  $F_M$ . Le Benoxacor semble inhiber la réduction complète du PSII. Le transport des électrons ( $q_{\text{prel}}$ ) est quelque peu inhibé avec le Benoxacor mais ne diminue pas beaucoup plus avec le mélange Aatrex et Benoxacor. Le quenching non-photochimique ( $q_{\text{Nrel}}$ ) diminue quelque peu avec le Benoxacor mais beaucoup plus avec le mélange. La valeur de  $UQF_{\text{rel}}$  augmente avec le Benoxacor seul et plus encore avec le mélange tandis que le quenching non-photochimique NPQ diminue avec le Benoxacor seul ou avec le mélange mais on remarque toutefois une récupération de NPQ lors de l'exposition de UTCC 632 au mélange Aatrex et Benoxacor. Le NPQ récupère avec la présence de l'atrazine dans le milieu, ce qui pourrait indiquer que le transport antennaire est actif tandis que  $UQF_{\text{rel}}$  qui augmente démontre que le PSII est malgré tout encore engorgé. Le  $F_M$  est diminué en présence de Benoxacor mais l'ajout d'Aatrex lui permet de récupérer quelque peu (données non présentées). Le PSII semble être moins réduit grâce à la présence du Benoxacor ( $F_M$  plus faible). Le Benoxacor pourrait ainsi affecter un des accepteurs primaires ou dévier les électrons vers une voie alterne, ce qui pourrait rendre l'atrazine moins dommageable du fait d'un flux d'électrons amoindri venant des transporteurs primaires à l'intérieur du PSII. Les effets des deux substances semblent présenter un certain antagonisme. On a noté dans la section précédente (7.5.2.) que les grosseurs des

cellules revenaient presque au niveau du témoin à 96 heures lorsque les cellules étaient exposées au Benoxacor et à l'Aatrex tout à la fois. Cette augmentation de volume en diminuant le ratio surface/volume diminue la captation du de l'atrazine qui deviendrait ainsi moins délétère.

Tableau 7.5.3. Effets du Benoxacor seul (2% (p/p)) et avec 0,1  $\mu$ M d'Aatrex sur les voies de dissipation de l'énergie chez UTCC 632 exposée pendant 96 heures. B signifie Benoxacor et AA est l'Aatrex. É-t signifie écart-type.

BENOXACOR								
632		$\Phi'_M$	$q_{Prel}$	$q_{Nrel}$	$q_P$	$q_N$	UQF <sub>rel</sub>	NPQ
Témoin 96 h	moy	0,436	0,657	0,299	0,938	0,312	0,044	0,200
	É-t	0,003	0,022	0,029	0,009	0,030	0,008	0,026
B 2%	moy	0,037*	0,572*	0,275	0,789*	ND	0,153*	0,018*
	É-t	0,009	0,019	0,007	0,025	nd	0,018	0,005
0,1 $\mu$ M AA+B 2%	moy	0,243*	0,553*	0,187	0,680*	0,230	0,260*	0,083*
	É-t	0,017	0,017	0,019	0,005	0,015	0,003	0,015
Variations								
B 2%	%	-92	-13	-8	-16	ND	+248	-91
0,1 $\mu$ M AA+B 2%	%	-44	-16	-37	-28	-26	+491	-59

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

#### 7.5.4. PEA

Le paramètre biophysique ABS/RC est affecté par la présence de Benoxacor et d'Aatrex (Tableau 7.5.4.). Il est haussé de 11% lorsqu'il y a du Benoxacor seul dans le milieu tandis que l'ajout d'Aatrex le fait redescendre. L'effet des deux substances semble être antagoniste. Ce qu'il est curieux de constater est la hausse de la taille des antennes lorsque l'on ajoute du Benoxacor. Cette hausse a été constatée avec UTCC 299 mais l'ampleur de la hausse est très élevée dans le cas de UTCC 299. UTCC 632 ne semble pas être affectée autant par le Benoxacor. On a vu que le UQF<sub>rel</sub> augmentait avec du Benoxacor seul mais encore plus en présence d'atrazine qui semble être le plus grand contributeur au blocage du transport des

électrons le long de la chaîne de transport des électrons ( $q_p$ ). Cette hausse était liée avec une récupération de NPQ dans le cas du mélange Aatrex/Benoxacor et une récupération de Eto/RC (transport électronique au sein du PSII). Le Benoxacor seul semble congestionner plus le PSII et bloquer le NPQ. Le transport des électrons récupère (Eto/RC) avec le mélange versus le Benoxacor seul mais il semble avoir du mal à passer le niveau des quinones. Il semble y avoir moins de centres réactionnels actifs par section transversale (RC/CS) et ceux qui le sont sont stimulés plus fortement lorsqu'il n'y a que du Benoxacor dans le milieu. Il semble que le Benoxacor affecte principalement la taille antennaire, ou plutôt le nombre de photons captés par centres réactionnels, tout en diminuant la quantité de centres réactionnels actifs et contribuant à l'absorbance totale. L'atrazine serait en mesure de contrecarrer le Benoxacor ce qui diminuerait l'effet du phytoprotecteur au niveau du PSII, néanmoins il est plus actif au niveau du blocage le long de la chaîne de transport des électrons.

Il semble que la taille des antennes soit très impliquée dans les effets du Benoxacor. La conformation peut aussi être une variable et une des voies de dissipation possible est le changement de conformation du PSII qui permettrait de capter moins d'énergie et qui la ré-émettrait sous forme de fluorescence.

Les cyanobactéries ne sont pas toujours sensibles au Benoxacor si l'on en croit l'étude de Day et Hodges (1996) qui ont déterminé que le Benoxacor inhibait la croissance de l'algue verte *Selenastrum capricornutum* (1,730-2,050  $\mu\text{g/L}$ ) mais pas celle de la cyanobactérie *Anabaena cylindrica*. L'étude en question porte sur les effets du Benoxacor seul sur la croissance de ces espèces mais pas les interactions possibles avec d'autres substances, ce qui semble être un point majeur dans les effets du Benoxacor.

Les plantes connues pour détoxifier l'atrazine utilisent l'hydroxylation (Caltelfranco *et al.*, 1961; Cherifi *et al.*, 2001) induite par les benzozazinones, la conjugaison catalysée par des *glutathion-S-transférases* (Shimabukuro *et al.*, 1970) et la dé-alkylation (Kearney *et al.*, 1965; Shimabukuro *et al.*, 1966; Edwards et Owen, 1989) passant probablement par les cytochromes  $P_{450}$ . En plus de la conjugaison au glutathion, la glycolysation des xénobiotiques est une réaction de détoxification observée chez certaines plantes. Plusieurs xénobiotiques, tels que des herbicides, passent par une voie de glycolysation après des réactions d'hydroxylations catalysées par des *cytochromes P<sub>450</sub> monooxygénases* (Miller *et al.*, 1996).

Tableau 7.5.4. Effets du Benoxacor seul (2% (p/p)) et avec 0,1  $\mu$ M d'Aatrex sur les paramètres biophysiques de UTCC 632 exposée pendant 96 heures. B signifie Benoxacor et AA est l'Aatrex.

BENOXACOR							
632	ABS/RC		ETo/RC	TRo/RC	DIo/RC	RC/CS	RC/ABS
96 h							
Témoin 96 h	7,780	1,600	3,254	-4,526	0,221	0,129	
Écart-type	0,210	0,050	0,094	0,124	0,006	0,004	
B 2%	8,604	0,384*	3,358	-5,246	0,156	0,100*	
Écart-type	0,344	0,033	0,153	0,497	0,032	0,019	
0,1 μM AA+B 2%	8,065	0,650*	3,321	-4,745	0,209	0,116	
Écart-type	1,092	0,121	0,374	0,731	0,025	0,008	
Variations							
B 2%	%	+11	-76	+3	+16	-29	-22
0,1 μM AA+B 2%	%	+4	-59	+2	+5	-5	-10

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

Les pesticides qui ont des effets délétères sur les organismes contiennent généralement des sites électrophiles (basse densité électronique) qui peuvent créer des liens sur des sites nucléophiles cellulaires (Marcacci, 2004). Le chlore est souvent impliqué dans l'électrophilie d'une molécule et l'atrazine ainsi que le Benoxacor en contiennent, ce qui rendrait ces molécules toxiques. Un organisme en mesure d'enlever cet atome de chlore par hydroxylation et conjugaison pourrait être protégé contre ces substances. Le remplacement de l'atome de chlore par un groupement hydroxyle résulte en métabolites non toxiques (Caltelfranco *et al.*, 1961). Ceci pourrait expliquer en partie la tolérance du maïs à l'atrazine car la formation de l'hydroxyatrazine inactif est une forme de métabolisme de l'atrazine dans les racines et les feuilles durant la première semaine chez le maïs (Cherifi *et al.*, 2001).

Le benoxacor (un benzoxazine) a une structure ayant une certaine similitude avec les benzoxazinoïdes. Celui-ci contient deux atomes de chlore qui peuvent le rendre toxique mais l'enlèvement de ceux-ci par une voie quelconque peut possiblement le rendre sans danger. Les benzoxazinoïdes sont présents dans les plantes sous forme de glucosides.

Des benzoxazinones naturels ont déjà été isolés et étudiés (Hamilton *et al.*, 1962 ; Niemeyer, 1988 ; Schulz *et al.*, 1994 ; Macias *et al.*, (2005) Le 2,4-dihydroxy-(2*H*)-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (DIBOA) et le 2,4-dihydroxy-7-methoxy-(2*H*)-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (DIMBOA) ont démontré une activité biologique ainsi que certains de leurs produits de dégradation et analogues synthétiques. Le benzoxazinone naturel majeur chez le maïs est le DIMBOA (2,4-dihydroxy-7-methoxy-(2*H*)-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one) qui est impliqué dans la défense naturelle des plantes contre les bactéries, les moisissures et les insectes (Bohidar *et al.*, 1986 ; Niemeyer, 1988 ; Leszczynski *et al.*, 1995 ; Figeora *et al.*, 1999 ; Wilkes *et al.*, 1999). Il est aussi impliqué dans la détoxification des herbicides de type s-triazine par hydroxylation dans les plantes (Hamilton et Moreland, 1962 ; Hamilton, 1971 ; Tipton *et al.*, 1971 ; Raveton *et al.*, 1997). Selon Wenger *et al.*, (2005) DIMBOA aurait un effet sur la dégradation de l'atrazine. Dans des expériences *in vitro*, des mélanges de benzoxazinone extraites de plantules de maïs peuvent transformer 90 % de l'atrazine en hydroxyatrazine en 24 heures (Runes *et al.*, 2001). L'hydrolyse non-enzymatique de l'atrazine en hydroxyatrazine catalysée par le benzoxazinone a été perçue par certains chercheurs comme un facteur responsable de la résistance du maïs à l'atrazine (Castelfranco *et al.*, 1961; Hamilton et Moreland, 1962).

Bravo et Lazo, (1996) ont démontré que certains benzoxazinones avaient des propriétés antialgales et antifongiques en faisant leurs expériences sur *Chlorella xanthella* et *Candida albicans*. Dans l'expérience de Macias *et al.*, (2005) on a démontré que les analogues synthétiques des benzoxazinoïdes possédaient une forte action inhibitrice de la croissance pour *Lycopersicon esculentum* (tomate), *Allium cepa* (oignon) et *Lepidium sativum* (cresson). Le D-DIMBOA (4-hydroxy-7-methoxy-(2 H)-1,4-benzoxazin-3(4 H)-one) et le D-DIBOA (4-hydroxy-(2 H)-1,4-benzoxazin-3(4 H)-one), deux benzoxazinones synthétiques, seraient selon Macias *et al.*, (2005) des candidats adéquats pour le développement de modèles herbicides basés sur des squelettes 1,4-benzoxazines. Les composés de structures similaires au DIBOA (2,4-dihydroxy-(2 H)-1,4-benzoxazin-3(4 H)-one) tels que le D-DIBOA (4-hydroxy-(2 H)-1,4-benzoxazin-3(4 H)-one), le D-HBOA ((2*H*)-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one) et surtout le ABOA (4-acétoxy-(2 H)-1,4-benzoxazin-3(4 H)-one), un dérivé *N*-acétyl de D-DIBOA, ont montré des capacités d'inhibition de la croissance très élevées. Un analogue des benzoxazines tel que le Benoxacor (4-(dichloroacétyl)-3,4-dihydro-3-méthyl-2*H*-1,4-benzoxazine) de par son squelette 1,4-benzoxazine pourrait possiblement avoir un effet délétère sur certains organismes non-cibles. Par contre, un organisme capable de libérer ses atomes de chlore par hydroxylation et conjugaison pourrait être plus résistant à la substance.

Dans notre étude, il semble que le Benoxacor soit un facteur intervenant dans la toxicité de l'atrazine. On ne peut tirer aucune conclusion sur le fait que les cyanobactéries sont, en général, sensibles au Benoxacor ou non car très peu d'études sont disponibles sur les effets de ce phytoprotecteur sur les plantes non-cibles et les algues. Nous avons toutefois démontré qu'il y a des différences de sensibilité au sein d'une même espèce (UTCC 299 versus UTCC 632). Plus d'études sur les effets de ce phytoprotecteur sur les différentes espèces d'algues seraient nécessaires.



## CHAPITRE VIII

### VIII. COMPARAISON ENTRE LES DIFFÉRENTS HERBICIDES

#### 8.1.UTCC 299.

##### 8.1.1 PAM

L'atrazine seul affecte en général moins à la baisse l'efficacité opérationnelle ( $\Phi'_M$ ) et le transport des électrons ( $q_{rel}$ ). Le Benoxacor affecte les  $F_M$ , les faisant baisser considérablement. Il semble que le PSII ne soit pas capable de se réduire entièrement en présence du Benoxacor. Il est possible aussi qu'une part des électrons soient déviée par une voie alterne. En fait, le Benoxacor pourrait affecter le système photosynthétique en différents endroits, c'est-à-dire affecter le PSII et dans un même temps le PSI qui pourrait devenir moins performant, être moins en mesure de drainer les électrons et permettre la hausse de  $UQF_{rel}$ . La présence du Benoxacor avec l'Aatrex baisse la valeur du NPQ et hausse celle du  $q_N$  et  $q_{Nrel}$  (Tableau 8.1.1.). Le *quenching* non-photochimique qui récupère indique que l'organisme est plus efficace à dissiper l'énergie captée. Une part de la fonction du NPQ est diminuée par la présence du Benoxacor, on pourrait penser que la composante  $q_T$  de NPQ soit gênée. Comme tous ces paramètres du *quenching* non-photochimiques sont liés, une baisse d'une des composantes est compensée par l'autre.

La présence du Benoxacor augmente les effets négatifs sur la photosynthèse dans tous les cas mais la présence du métolachlore semble inhiber, en partie, l'effet antagoniste du Benoxacor avec l'atrazine. Il peut y avoir compétition entre le phytoprotecteur et l'herbicide lorsque les structures conformationnelles entre les deux substances sont semblables (Yenne et Hatzios, 1991). De plus, on sait que le Benoxacor est toujours utilisé conjointement avec un chloroacétanilide qui sera détoxiqué chez certains cultivars grâce à l'activité accrue de la GST déclenchée par la présence du phytoprotecteur. Lors des traitements faits avec le primextra reconstitué avec ajout d'une concentration de 2% (p/p) de Benoxacor, les paramètres photosynthétiques semblent récupérer sauf ceux relatifs aux *quenchings* non-photochimiques, ce qui pourrait confirmer l'effet du Benoxacor sur le  $q_T$  et possiblement aussi sur le PSI.

Tableau 8.1.1. Variations des paramètres de cinétiques de fluorescence lorsque comparés aux contrôles chez UTCC 299 exposée à 0,1  $\mu\text{M}$  d'Aatrex, un mélange de 0,1  $\mu\text{M}$  d'Aatrex et de Benoxacor 2% (p/p) et du Primextra reconstitué avec Benoxacor 2% (p/p) pendant 96 heures. AA est Aatrex, B est Benoxacor et PR est Primextra reconstitué.

COMPARAISON DES VARIATIONS VS TÉMOIN								
299		$\Phi'_M$	$q_{\text{Prel}}$	$q_{\text{Nrel}}$	$q_P$	$q_N$	$UQF_{\text{rel}}$	NPQ
0,1 $\mu\text{M}$ Aatrex	%	-21	-9	-44	-27	-36	+495	-51
0,1 $\mu\text{M}$ AA+B 2%	%	-90	-57	+9	-56	+26	+813	-74
0,1 $\mu\text{M}$ PR+B 2%	%	-68	-29	-32	-41	-22	+725	-70

#### 8.1.2. PEA.

L'Aatrex affecte la taille de l'antenne à la baisse tandis que les mélanges ayant du Benoxacor haussent le paramètre ABS/RC (Tableau 8.1.2.). De plus, le transport des électrons est moins affecté par la présence du phytoprotecteur. Les électrons excédentaires créés par le blocage induit par présence de l'herbicide semblent être redirigés vers une voie alterne. La captation des électrons par la trappe du PSII augmente en présence du Benoxacor, ce qui pourrait démontrer qu'il y a un donneur d'électrons à la chaîne de transport des électrons. La dissipation sous forme de chaleur augmente ( $D_{\text{Io}}/\text{RC}$ ) avec les mélanges contenant du Benoxacor tandis que les centres réactionnels actifs par section transversale ( $\text{RC}/\text{CS}$ ) et les centres réactionnels du PSII contribuant à l'absorbance totale du PSII ( $\text{RC}/\text{ABS}$ ) diminuent, ce qui indique que l'énergie captée par le PSII est déviée vers une autre voie. Il se pourrait que le PSI prenne la relève.

Tableau 8.1.2. Variations des paramètres biophysiques lorsque comparés aux contrôles chez UTCC 299 exposée à 0,1  $\mu\text{M}$  d'Aatrex, un mélange de 0,1  $\mu\text{M}$  d'Aatrex et de Benoxacor 2% (p/p) et du Primextra reconstitué avec Benoxacor 2% (p/p) pendant 96 heures. AA est Aatrex, B est Benoxacor et PR est Primextra reconstitué.

COMPARAISON DES VARIATIONS VS TÉMOIN							
299		ABS/RC	ETo/RC	TRo/RC	Dio/RC	RC/CS	RC/ABS
0,1 $\mu\text{M}$ Aatrex	%	-22	-72	-16	-25	+35	+29
0,1 $\mu\text{M}$ AA+B 2%	%	+279	-50	+1	+473	-82	-73
0,1 $\mu\text{M}$ PR+2%	%	+94	-58	-10	+154	-61	-49

## 8.2. UTCC 632.

### 8.2.1. PAM.

Les mélanges contenant du Benoxacor abaissent plus l'efficacité opérationnelle ( $\Phi'_M$ ) que l'atrazine seul quoique la différence soit moins marquée que dans le cas de UTCC 299. Le transport des électrons ( $q_{\text{Prel}}$ ) est peu affecté quel que soit le traitement (Tableau 8.2.1.). Le Benoxacor affecte les  $F_M$ , les faisant baisser sauf en présence d'atrazine qui semble interférer avec le Benoxacor. Les baisses des  $F_o$  et  $F_M$  affectent moins UTCC 632 que UTCC 299. La présence du métolachlore permet la récupération de plusieurs paramètres. Il pourrait y avoir antagonisme entre le métolachlore et le Benoxacor dans le cas des traitements faits avec UTCC 632.

Les  $q_N$ ,  $q_{\text{Nrel}}$  ainsi que NPQ récupèrent chez les cyanobactéries exposées au mélange contenant du métolachlore, de l'atrazine et du Benoxacor. Les effets du Benoxacor sur la photosynthèse de UTCC 632 sont passablement moins marqués qu'avec UTCC 299.

Tableau 8.2.1. Variations des paramètres de cinétiques de fluorescence lorsque comparés aux contrôles chez UTCC 632 exposée à 0,1  $\mu\text{M}$  d'Aatrex, un mélange de 0,1  $\mu\text{M}$  d'Aatrex et de Benoxacor 2% (p/p) et du Primextra reconstitué avec Benoxacor 2% (p/p) pendant 96 heures. AA est Aatrex, B est Benoxacor et PR est Primextra reconstitué.

COMPARAISON DES VARIATIONS VS TEMOIN								
632		$\Phi'_M$	$q_{Prel}$	$q_{Nrel}$	$q_P$	$q_N$	UQFrel	NPQ
0,1 $\mu\text{M}$ AA	%	-23	-11	-46	-22	-25	+357	-52
0,1 $\mu\text{M}$ AA+B 2%	%	-44	-16	-37	-28	-26	+491	-59
0,1 $\mu\text{M}$ PR+B 2%	%	-38	-15	-30	-24	-14	+396	-41

### 8.2.2. PEA.

L'Aatrex affecte un peu plus à la baisse la grosseur de l'antenne que le mélange ayant du Benoxacor conjointement à l'Aatrex (Tableau 8.2.2). Le mélange fait moins diminuer la grosseur de l'antenne dont la taille revient à peu près à la normale. Tro/RC récupère, ce qui indique que les électrons sont en mesure de dépasser la quinone A et d'entrer dans la chaîne de transport des électrons. La dissipation non-photochimique récupère chez les algues exposées au mélange Aatrex/Benoxacor tandis que les centres réactionnels du PSII sont moins excités. Les électrons en surplus créés par le blocage induit par la présence de l'herbicide semblent être redirigés, ici aussi, vers une voie alterne ou bien il y a un antagonisme entre les deux substances. On remarque surtout que les effets se font sentir principalement au niveau des antennes. Des différences structurelles et surtout pigmentaires pourraient possiblement expliquer les différences de sensibilité entre les deux espèces. Nous pouvons conclure de cette étude que UTCC 632 est plus résistante aux différents traitements que UTCC 299.

Tableau 8.2.2. Variations des paramètres biophysiques lorsque comparés aux contrôles chez UTCC 632 exposée à 0,1  $\mu\text{M}$  d'Aatrex, un mélange de 0,1  $\mu\text{M}$  d'Aatrex et de Benoxacor 2% (p/p) et du Primextra reconstitué avec Benoxacor 2% (p/p) pendant 96 heures. AA est Aatrex, B est Benoxacor et PR est Primextra reconstitué.

COMPARAISON DES VARIATIONS VS TÉMOIN							
632		ABS/RC	ETo/RC	TRo/RC	DIO/RC	RC/CS	RC/ABS
0,1 $\mu\text{M}$ AA	%	-15	-59	-11	-17	+19	+17
0,1 $\mu\text{M}$ AA+B 2%	%	+4	-59	+2	+5	-5	-10
0,1 $\mu\text{M}$ PR+B 2%	%	-12	-58	-8	-14	+16	+13

### 8.3. Spectres d'absorbances.

Le profil pigmentaire diffère entre les deux souches. Lorsqu'on regarde la figure 8.3. il semble que les phycobiliprotéines soient très présents chez UTCC 632 mais que les autres pigments soient moins présents (caroténoïdes, par exemple). On ne peut tirer une conclusion définitive de ces résultats du fait des faibles signaux mais on peut toutefois parler d'une tendance relativement forte. On peut néanmoins affirmer que les phycobiliprotéines sont très abondants chez la souche non-toxique (UTCC 632) tandis que UTCC 299 semble posséder plus de pigments en général. Toutefois, on ne note pas de pic qui se démarque au niveau des phycobiliprotéines. Il serait intéressant de refaire des spectres d'absorption avec de plus grand volumes d'aliquots frais plutôt qu'avec des échantillons filtrés. Les volumes filtrés étant très faibles, les signaux le sont d'autant et pourraient être plus affectés par la présence de bruits de fond.

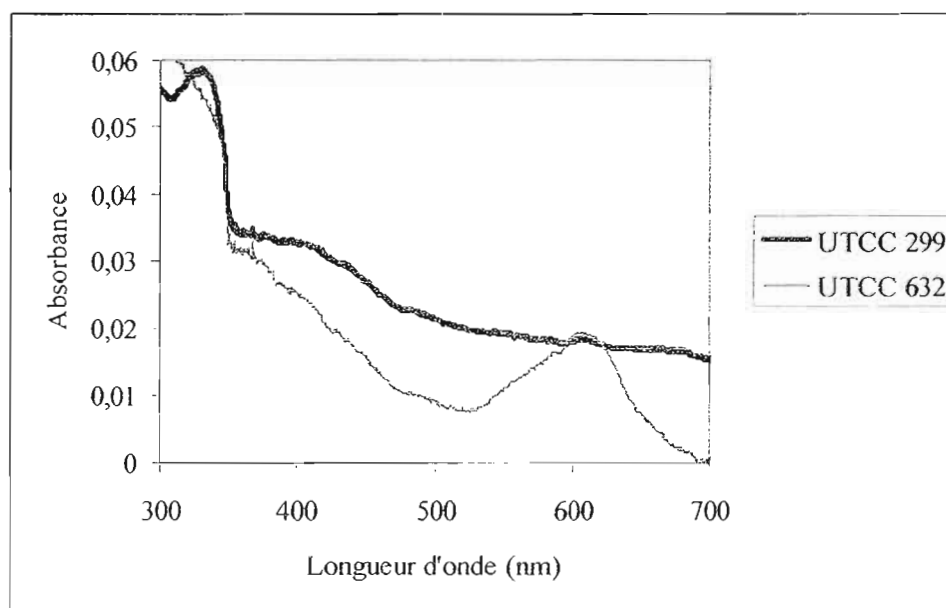


Figure 8.3. Spectres d'absorbance de UTCC 299 et UTCC 632. Le trait en gras est UTCC 299.

#### 8.4. Différences entre les espèces.

Des tests statistiques (ANOVA complexe et ANCOVA) ont été faits afin de déterminer quels sont les facteurs principaux qui influent sur les effets notés. Une ANCOVA ayant les effets espèces et concentration de Primextra II magnum et la variable ABS/RC a été faite. Ce test a montré que le modèle est expliqué avec un  $R^2$  de 0,95 et que les deux effets expliquent les variations notées sur la taille des antennes ( $P < 0,05$ ). Par contre, l'effet « espèces » est celui qui explique le plus les variations notées (F ratio : 205 pour espèces vs 159 pour concentration), l'espèce la plus affectée étant UTCC 299 (taille des antennes plus affectée à la baisse). L'interaction est significative ( $P < 0,001$ ), ce qui signifie que l'effet du Primextra II magnum est différent selon les espèces en ce qui a trait à la taille des antennes.

La two-way ANOVA ayant pour effets l'espèce et la concentration de Primextra II magnum et pour variable les espèces réactives oxygénées (ERO) produites à 24 heures nous montre que l'espèce est le facteur qui influe principalement ( $P < 0,0001$ ) dans la formation des ERO. L'espèce la plus touchée est UTCC 299 (hausse de +37% vs 18% pour UTCC 632). Un test de Tukey fut fait par la suite afin de déterminer quelles moyennes étaient véritablement

significatives. Les différences se situaient principalement entre les espèces, ce qui confirme que la production de ERO est plus présente chez UTCC 299.

Une seconde two-way ANOVA a été faite avec les mêmes effets mais la variable testée était la quantité de chlorophylle *a* par cellule à 96 heures. Cette ANOVA a démontré que les différentes concentrations de Primextra II magnum affectait à la baisse et de manière significative ( $P < 0,0365$ ) la quantité de chlorophylle par cellules. L'interaction espèce\* concentration est significative ( $P < 0,002$ ), ce qui peut signifier que le Primextra II magnum affecte de manière différente les deux espèces. Le test de Tukey confirme que les différences entre les moyennes sont significatives entre les témoins de UTCC 299 et UTCC 632. Les autres différences se situaient entre le témoin de UTCC 299 et les traitements au Primextra II magnum.

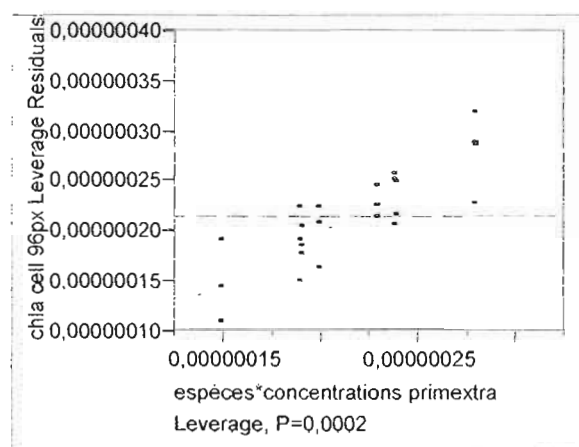


Figure 8.4. Two-way ANOVA montrant la quantité de chlorophylle *a* par cellule selon les espèces et la concentration de Primextra II magnum.

## CONCLUSION

Chez UTCC 299, les herbicides semblent affecter grandement le système antennaire du PSII, c'est-à-dire, le phycobilisome, ainsi que la chlorophylle *a*. L'atrazine est un facteur important dans les effets car sa présence induit un effet de verdissement (greening effect) qui peut favoriser la formation des espèces réactives oxygénées lors d'un blocage du transport des électrons. Une hausse de la quantité de chlorophylle ou de pigments constituant les phycobilisomes, implique une plus grande captation de l'énergie lumineuse qui n'est pas en mesure d'être utilisée dans le transport des électrons vers le PSI à cause du blocage créé par l'herbicide. La légère récupération des paramètres des *quenchings* non-photochimiques peut être liée à une activité accrue du PSI et de son transport cyclique des électrons, ce qui allègerait les effets de l'énergie excédentaire sur le PSII. Le transfert antennaire ( $q_T$ ) serait un facteur à considérer dans la récupération même s'il ne semble pas suffire à la tâche. L'état  $q_T$  peut amener une baisse de la grosseur de l'antenne du PSII, mais dans notre cas il serait plus probable que la baisse de la grosseur des antennes provienne de la dégradation des phycobilisomes par des espèces réactives oxygénées. La formation de ERO notée à 24 heures semble être liée à la hausse de la quantité de chlorophylle. Dans diverses conditions de stress, il a déjà été constaté qu'un complexe protéine/chlorophylle appelé CP43' pouvait être synthétisé chez les cyanobactéries afin de servir d'antennes internes qui compenseraient la perte de l'antenne externe (phycobilisomes). Ces complexes composés de plusieurs molécules de chlorophylles et de caroténoïdes peuvent être une réponse générale contre les stress et la hausse de chlorophylle notée chez UTCC 299 lors de l'effet de verdissement pourrait être due à cette réponse adaptative. Si les antennes grossissent ou si la quantité de molécules de chlorophylles de l'antenne interne augmente, et par extension, les pigments qui captent l'énergie, on peut s'attendre à ce que le PSII soit surexcité s'il existe un blocage du transport des électrons au niveau de la quinone A. La hausse des pigments collecteurs augmente la probabilité de stimuler les centres réactionnels, ce que nous pouvons constater lors des hausses des paramètres RC/CS et RC/ABS. Les électrons étant retenus un certain temps prisonnier du complexe, ils peuvent induire la formation des espèces réactives oxygénées ou de chlorophylle radicalaire. *À contrario*, une baisse de la quantité de pigments, probablement due à la destruction par les ERO, diminuera les probabilités de formation des ERO. L'Aatrex affecte moins la grosseur de l'antenne que les mélanges ayant du Benoxacor.



La composition pigmentaire peut influencer sur la sensibilité, certains pigments pouvant possiblement résister plus ou moins à la photoinhibition. Plusieurs cyanobactéries ne contiennent pas de phycoérythrine mais une cyanobactérie en contenant pourrait être plus sensible à la photoinhibition. Il existe 3 classes de cyanobactéries selon la façon de faire l'adaptation chromatique. La classe I ne change pas la composition de ses pigments, la classe II ne change que son contenu en phycoérythrine tandis que les cyanobactéries de classe III peuvent faire varier le contenu en phycocyanine et en phycoérythrine. Il est fort possible que les quantités et ratios des différents pigments composant les phycobilisomes de UTCC 299 et UTCC 632 soient forts différents et soient une des raisons de la résistance relative de UTCC 632 versus UTCC 299. Les herbicides déclenchant une hausse de la synthèse de la chlorophylle (greening effect), ceci pouvant être un mécanisme d'acclimatation, peuvent lors du blocage être la cause de la formation de ERO destructeurs chez une espèce développant un effet de verdissement telle UTCC 299. Dans le cas de UTCC 632, dans les conditions de luminosité stables de la chambre de croissance, son peu de variabilité au niveau de ses pigments (pas d'effet de verdissement marqué) peut l'avantager. La stabilité du contenu cellulaire en pigments de UTCC 632 semble la protéger. Il ne semble pas qu'il y ait un effet de verdissement marqué d'où le peu de ERO formées. De plus, la quantité de pigments chez UTCC 632 augmente peu au cours du temps tandis que UTCC 299 voit sa quantité de pigments augmenter grandement au cours des 4 jours de tests. Une forte hausse pigmentaire dans des conditions de blocage du transport des électrons peut favoriser grandement la formation d'espèces réactives dommageables. Des tests utilisant des conditions lumineuses très variées pourraient être faits afin de mimer les conditions trouvées dans le milieu aquatique.

UTCC 299 exposée à de l'atrazine seul présente sensiblement les mêmes effets que ceux observés avec le Primextra II magnum. Toutefois, l'atteinte est beaucoup moins sévère avec l'Aatrex. En fait, les deux souches sont moins affectées par l'Aatrex que par le Primextra II magnum. Le Benoxacor semble être le facteur aggravant les effets de l'atrazine car les tests faits avec le métolachlore avec et sans Benoxacor ne montrent pas d'effets néfastes chez UTCC 299 et ne sont pas très marqués chez UTCC 632. Chez UTCC 299, la grosseur des cellules ne diminue pas autant avec l'Aatrex que dans le cas du Primextra II magnum. Il est possible que l'une des substances du mélange Primextra soit la cause de la grande baisse du volume cellulaire, ce qui peut augmenter le ratio surface : volume. Les plus petites cellules ont une prise en charge des substances plus élevée, ce qui peut augmenter la captation du toxique par les

cellules augmentant de cette façon la toxicité (Weiner *et al.*, 2004). Finalement, l'une des substances dans le mélange Primextra en augmente les effets. L'atrazine est l'agent qui agit principalement mais la présence du Benoxacor augmente les effets même s'il semble exister une légère compétition entre les deux substances. Par contre, la présence du métolachlore semble être un agent majeur dans la compétition avec le Benoxacor. Des similarités structurales pourraient en être la cause. Une baisse de la grosseur des cellules induite par la présence du Benoxacor peut permettre de capter plus l'atrazine amplifiant ainsi les effets. Il semblerait qu'un mécanisme de protection contre les effets nocifs des espèces réactives oxygénées se mette en branle car on observe une forte baisse de ceux-ci à 96 heures lors de l'exposition de UTCC 299 à l'Aatrex.

La présence du Benoxacor influe beaucoup sur les paramètres des *quenchings* non-photochimiques et sur les paramètres biophysiques liés aux antennes. Une explication à tous ces effets peut être que le Benoxacor induise un changement de configuration des antennes, ce qui permet de capter moins d'énergie, d'où la baisse de la photochimie, la hausse marquée de la ré-émission de l'énergie sous forme de fluorescence. La récupération remarquée dans les *quenchings* non-photochimiques ne semble pas être le fait de la composante  $q_E$  (chaleur) parce que ce mécanisme de régulation n'existe pas chez les cyanobactéries (cycle des xanthophylles). Le transfert antennaire ( $Q_T$ ), composante liée au transfert de l'antenne du PSII vers le PSI est une composante très active chez les cyanobactéries et pourrait être la composante principale impliquée dans les *quenchings*. Néanmoins, il existe un taux élevé de zéaxanthine chez les cyanobactéries, pigment qui est un produit existant dans le cycle des xanthophylle et qui peut être en mesure de protéger contre les effets nocifs de la photo-inhibition.

Dans les tests faits avec le Benoxacor et l'Aatrex, le transport des électrons est affecté par la présence du phytoprotecteur. Les électrons excédentaires créés par le blocage induit par présence de l'herbicide semblent être redirigés vers une voie alterne. Le PSII étant moins réduit chez UTCC 632 ( $F_M$  diminué) par la présence du Benoxacor en mélange avec de l'Aatrex, l'atrazine qui est connu pour produire une congestion au niveau du PSII devient ainsi moins dommageable du fait d'un flux d'électrons amoindri. Le Benoxacor pourrait ainsi affecter un des accepteurs primaires, être lui-même un accepteur d'électrons ou dévier les électrons vers une voie alterne.

La transformation des xénobiotiques démarre normalement par une étape d'oxydation ou d'hydrolyse servant à créer un groupe fonctionnel pouvant servir à une conjugaison ultérieure à des substances endogènes telles que le glutathion par exemple. Les benzoxazinones pourraient jouer un rôle important dans ce métabolisme. Les benzoxazinones sont des glucosides de dérivés 1,4-benzoxazine (Hofman et Hofmanova, 1969). Des auteurs ont postulé que le benzoxazinone majeur du maïs (DIMBOA/(3,4-dihydro-2,4-dihydroxy-7-méthoxy-2H-1,4-benzoxazin-3-one), est impliqué dans la défense naturelle de plantes contre les bactéries, les champignons et les insectes (Figueora *et al.*, 1999; Niemeyer, 1988) et dans la détoxification des herbicides de type s-triazine par hydroxylation (Tipton *et al.*, 1971; Raveton *et al.*, 1997). Les deux voies de détoxification, l'hydroxylation par les benzoxazinones et la formation de conjugué de glutathion ont été démontré chez le maïs par Cherifi *et al.*, (2001). Un analogue de benzoxazinones pourrait-il interférer en partie avec un s-triazine tel que l'atrazine?

Nous avons montré que la souche non-toxique (UTCC 632) est plus résistante que la souche toxique (UTCC 299) aux effets des herbicides Primextra Il magnum et Aatrex. On voit bien dans cette étude que les herbicides et les différents additifs peuvent affecter les différentes souches d'une même espèce de façon différente affectant ainsi les populations et risquant de produire des déséquilibres même au sein d'une même espèce. Les tests ont été faits à des concentrations très faibles mais nous ont permis toutefois de mettre en évidence qu'il existe des effets délétères de ces substances sur la photosynthèse de *Microcystis*. Ces tests ont été faits sur une courte période mais il serait intéressant de faire des tests sur de plus longues périodes car un traitement chronique pourrait affecter UTCC 632 et UTCC 299 de manière différente. UTCC 632 pourrait être affecté à plus long terme d'une façon marquée. De plus, il serait bon de vérifier le degré de récupération dans le temps dans un milieu dilué et si des résistances à ces substances pourraient se développer.

## RÉFÉRENCES.

- ABE, T., LAWSON, T., WEYERS, J., D., B., CODD, G., A. 1996. Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves: implications for current spray irrigation practice. *New Phytologist*. 133: 651-658.
- ADAMS, C., A., BLEE, E., CASIDA, J., E. 1983. Dichloroacetamide herbicide antidotes enhance sulfate metabolism in corn roots. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 19: 350-360.
- AHLGREN, GUNNEL, LUNDSTEDT, LISA, BRETT, MICHAEL, FORSBERG, CURT. 1990. Lipid composition and food quality of some freshwater phytoplankton for cladoceran zooplankters. *Journal of plankton research*. 12: 809-818.
- ALLEN M., SMITH, M. 1969. Nitrogen chlorosis in blue-green algae. *Archives of Microbiology*. 63: 114-120.
- ALLEN, MARY, MENNES, TURNBURKE, ANNE, C., LAGACE, EMILY, A., STEINBACK, KATHERINE, E. 1983. Effects of photosystem II herbicides on the photosynthetic membranes of the cyanobacterium *Aphanocapsa* 6308. *Plant Physiology*. 71: 388-392.
- ALTENBURGER, R., BÖDEKER, W., FAUST, M., W., GRIMME, L., H. 1990. Evaluation of the isobologram method for the assessment of mixtures of chemicals, combination effect studies with pesticides in algal biotests. *Ecotoxicology and environmental safety*. 20 : 98-114.
- ANDERSON, J., M., PARK, Y.-I., CHOW, W., S., 1997. Photoinactivation and photoprotection of photosystem II in nature. *Physiologia Plantarum*. 100: 214-223.
- APPENROTH, K.-J., STOCKEL, J., SRIVASTAVA, A., STRASSER, R., J. 2001. Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll *a* fluorescence measurements. *Environmental Pollution*. 115: 49-64.
- ASADA, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50: 601-639.
- ASADA, K. 2000. The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*. 355: 1419-1431.
- ASHIDA, HIROYUKI, SAWA, YOSHIHIRO, SHIBATA, HITOSHI. 2005. Cloning, Biochemical and Phylogenetic Characterizations of  $\gamma$ -Glutamylcysteine Synthetase from *Anabaena* sp. PCC 7120. *Plant and Cell Physiology*. 46: 557-562.
- ASTIER, C., VERNOTTE, C., DERVARTANIAN, M., JOSET-ESPARDELLIER, F., 1979. Isolation and characterization of two DCMU-resistant mutants of the blue-green alga *Aphanocapsa* 6714. *Plant Cell Physiology*. 20: 1501-1510.

- BADGER, M., R., SCHREIBER, U. 1993. Effects of inorganic carbon accumulation on photosynthetic oxygen reduction and cyclic electron flow in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Photosynthesis Research*. 37: 177–191.
- BECHTOLD, U., KARPINSKI, S., MULLINEAUX, P., M. 2005. The influence of the light environment and photosynthesis on oxidative signaling responses in plant-biotrophic pathogen interactions. *Plant, Cell and Environment*. Doi. 10.1111/j.1365-3040.2005.01340.x.
- BEHRA, R., GENONI, G., P., JOSEPH, A., L. 1999. Effects of atrazine on growth, photosynthesis, and between-strain variability in *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyceae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 37 : 36–41.
- BERNS, D., S., SCOTT, E. 1966. Protein aggregation in a thermophilic protein. Phycocyanin from *Synechococcus lividus*. *Biochemistry*. 5: 1528–1533.
- BIBBY, T., S., NIELD, J., BARBER, J. 2001a. Iron deficiency induces the formation of an antenna ring around trimeric photosystem I in cyanobacteria. *Nature*. 412: 743–745.
- BIBBY, T., S., NIELD, J., BARBER, J. 2001b. Three-dimensional model and characterisation of the iron-stress induced CP43'-photosystem I supercomplex isolated from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 43246–43252.
- BILGER, W., SCHREIBER, U. 1986. Energy-dependent quenching of dark-level chlorophyll fluorescence in intact leaves. *Photosynthesis Research*. 10: 303–308.
- BILGER, W., HEBER, U., SCHREIBER, U. 1988. Kinetic relationship between energy-dependent fluorescence quenching, light scattering, chlorophyll luminescence and proton pumping in intact leaves. *Z. Naturforsch.* 43c: 877–887.
- BILGER, W., BJÖRKMAN, O. 1990. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research*. 25: 173–185.
- BLOMQUIST, JOEL, D., DENIS, JANET, M., COWLES, JAMES, L., HETRICK, JAMES, A., JONES, DAVID, R., BIRCHFIELD, NORMAN, B. 2001. "Pesticides in selected water-supply reservoirs and finished drinking water, 1999-2000: Summary of results from a pilot monitoring program." Site USGS: [http://md.water.usgs.gov/nawqa/OFR\\_01-456.pdf](http://md.water.usgs.gov/nawqa/OFR_01-456.pdf) . Site consulté 05/07/2007.
- BOEKEMA, E., J., HIFNEY, A., YAKUSHEVSKA, A., E., PIOTROWSKI, M., KEEGSTRA, W., BERRY, S., MICHEL, K.-P., PISTORIUS, E., K., KRUIP, J. 2001. A giant chlorophyll-protein complex induced by iron deficiency in cyanobacteria. *Nature* 412: 745–748.
- BÖGER, PETER, MATTHES, BERND, SCHMALFUß J. 2000. Towards the primary target of chloroacetamides-new findings pave the way. *Pest Management Science*. 56 : 497–508.
- BOHIDAR, K., WRATTEN, S., D., NIEMEYER, H., M. 1986. Effects of hydroxamic acids on the resistance of wheat to the aphid *Sitobion avenae*. *Annu. of Applied Biology*. 109: 193–198.

- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H., R., LONG, S., P., BAKER, N., R., ÖQUIST, G., SHREIBER, U., LECHNER, E., G. 1989. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology*. 3: 497-514.
- BORDAS, B., KOMIVES, T., SZANTO, Z., LOPATA, A. 2000. Comparative three-dimensional quantitative structure-activity relationship study of safeners and herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 926-931.
- BOUSSIBA, S., RICHMOND, A., E. 1980. C-phycocyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*. 125: 142-147.
- BRACK, WERNER, FRANK, HARTMUT. 1998. Chlorophyll *a* Fluorescence: A tool for the investigation of toxic effects in the photosynthesis apparatus. *Ecotoxicology and environmental safety*. 40: 34-41.
- BRAVO, R., LAZO, W. 1996. Antialgal and antifungal activity of natural hydroxamic acids and related compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 44 :1569-1571.
- BREAUX, E., J., PATANELLA, J., E., SANDERS, E., F. 1987. Chloroacetanilide herbicide selectivity: analysis of glutathione and homogluthione in tolerant, susceptible and safened seedlings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 35: 474-478.
- BRIANTAIS, J.-M., VERNOTTE, C., PICAUD, M., KRAUSE, G., H. 1979. A quantitative study of the slow decline of chlorophyll *a* fluorescence in isolated chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta*. 548: 128-138.
- BRYANT, D., A. 1986. The cyanobacterial photosynthetic apparatus: comparisons to those of higher plants and photosynthetic bacteria. *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Science*. 214: 423-500.
- BURNAP, R., L., TROYAN, T., SHERMAN, L., A. 1993. The highly abundant chlorophyll-protein of iron deficient *Synechococcus* sp. PCC 7942 (CP43') is encoded by the *isiA* gene. *Plant Physiology*. 103: 893-902.
- BUSCHMANN, C. 1995. Variation of the quenching of chlorophyll fluorescence under different intensities of the actinic light in wild-type plants of tobacco and in an Aurea mutant deficient of light-harvesting-complex. *Journal of Plant Physiology*. 145: 245-252.
- CADORET, J.-C., DEMOULIÈRE, R., LAVAUD, J., VAN GORKOM, H., J., HOUMARD, J., ETIENNE, A.-L. 2004. Dissipation of excess energy triggered by blue light in cyanobacteria with CP43' (*isiA*). *Biochimica et Biophysica Acta*. 1659: 100-104.
- CAIRNS, J., JR. 1983. Are single species toxicity tests alone adequate for estimating environmental hazard? *Hydrobiologia* 100: 47-57.
- CALAMARI, D., VIGHI, M. 1992. A proposal to define quality objectives for aquatic life for mixtures of chemical substances. *Chemosphere*. 25: 531-542.



CAMPBELL, DOUGLAS, HURRY, VAUGHAN, CLARKE, ADRIAN, K., GUSTAFSSON, PETTER, OQUIST, GUNNAR. 1998. Chlorophyll Fluorescence Analysis of Cyanobacterial Photosynthesis and Acclimation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 667-683.

CARDER, JUSTIN, P., HOAGLAND, KYLE, D. 1998. Combined effects of alachlor and atrazine on benthic algal communities in artificial streams. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 17: 1415-1420.

CARMICHAEL, W., W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites: the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*. 72: 445-459.

CARPENTIER, R., LA RUE, B., LEBLANC, R., M. 1984. Photoacoustic spectroscopy of *Anacystis nidulans*. III. Detection of photosynthetic activities. *Archives of Biochemistry and Biophysic*. 228: 534-543.

CARRINGER, R., D., RIECK, C., E., BUSH, L., P. 1978. Effect of R25788 on EPTC metabolism in corn (*Zea mays*). *Weed Science*. 26: 167-171.

CASANOVA, M., T., BURCH, M., D., BROCK, M., A., BOND, P., M. 1999. Does toxic *Microcystis aeruginosa* affect aquatic plant establishment? *Environmental Toxicology*. 14: 97-109.

CASTELFRANCO, P., FOY, C., DEUTSCH, D. 1961. Non enzymatic detoxification of 2-chloro-4,6-bis(ethylamino)-s-triazine (simazine) by extracts of *Zea mays*. *Weeds*. 9 : 580-591.

CEDERGREEN, NINA, STREIBIG, JENS, C. 2005. The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: assessment of predictive factors and hazard. *Pest Management Science*. 61: 1152-1160.

CHERIFI, M., RAVETON, M., PICCIOCCI, A., RAVANEL, P., TISSUT, M. 2001. Atrazine metabolism in corn seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*. 39: 665-672.

CLARK, GREGORY, M., GOOLSBY, DONALD, A. 2000. Occurrence and load of selected herbicides and metabolites in the lower Mississippi River. *The Science of The Total Environment*. 248: 101-113.

CLARKE, J., E., JOHNSON, G., N. 2001. In vivo temperature dependence of cyclic and pseudocyclic electron transport in barley. *Planta*. 212: 808-816.

CODD, G., A., COSSAR, J., D. 1978 The site of inhibition of photosystem II by 3-(3,4-dichlorophenyl) -N,N'-dimethylurea in thylakoids of the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Biochemistry and Biophysic Research Communication*. 83: 342-346.

CODD, GEOFFREY, A. 2000. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering*. 16: 51-60.

COLE, DAVID, PALLETT, KEN, RODGERS, MATTHEW. 2000. Discovering new modes of action for herbicides and the impact of genomics. *Pesticide Outlook*. 11: 223-229.

COLLEN, JONAS, DAVISON, IAN, R. 1997. *In vivo* measurement of active oxygen production in the brown alga *Fucus evanescens* using 2',7'-dichlorohydrofluorescein diacetate. *Journal of Phycology*. 33: 643-648.

COLLIER, J., L., GROSSMAN, A., R. 1992. Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same. *Journal of Bacteriology*. 174: 4718-4726.

COLLIER, JACKIE, L., GROSSMAN, ARTHUR, R. 1994. A small polypeptide triggers complete degradation of light-harvesting phycobiliproteins in nutrient-deprived cyanobacteria. *The EMBO Journal*. 13: 1039- 1047.

COLLIER, JACKIE, L., HERBERT, STEPHEN, K., FORK, DAVID, C., GROSSMAN, ARTHUR, R. 1994. Changes in the cyanobacterial photosynthetic apparatus during acclimation to macronutrient deprivation. *Photosynthesis Research*. 42: 173-183.

CONRAD, R., BUCHEL, C., WILHELM, C., ARSALANE, W., BERKALOFF, C., DUVAL, J.C. 1993. Changes in yield *in-vivo* fluorescence of chlorophyll as a tool for selective herbicide monitoring. *Journal of Applied Phycology*. 5: 505-516.

CORNIC, G., BUKHOV, N., G., WIESE, C., BLIGNY, R. HEBER, U. 2000. Flexible coupling between light-dependent electron and vectorial proton transport in illuminated leaves of C3 plants. Role of photosystem I-dependent proton pumping. *Planta*. 210: 468-477.

CROFTS, A., R., YERKES, C., T. 1994. A molecular mechanism for qE-quenching. *FEBS Letters*. 352: 265-270.

DAT, J., VANDENABEELE, S., VRANOVA, E., VAN MONTAGU, M., INZE, D., VAN BREUSEGEM, F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress. *Cellular and Molecular Life Science*. 57: 779-795.

DAVIES, JOANNA, CASELEY, JOHN, C. 1999. Herbicide safeners: a review. *Pesticide Science*. 55 : 1043-1058.

DAVIES, JOANNA. 2001. Herbicide safeners-Commercial products and tools for agrochemical research. *Pesticide Outlook*. 12: 10 -15.

DAY, K., E., HODGES, V. 1996. The toxicity of the herbicide metolachlor, some transformation product and a commercial safener to an alga (*Selenastrum capritornutum*), a cyanophyte (*Anabaena cylindrica*) and a macrophyte (*Lemna gibba*). *Water Quality Research Journal of Canada*. 31: 197-214.

DEAL, L., M., HESS, F., D. 1980. An analysis of growth inhibitory characteristics of alachlor and metachlor. *Weed Science*. 28: 168-175.



- DEAL, L., M., REEVES, J., T., LARKINS, B., A., HESS, F., D. 1980. Use of an *in vitro* protein synthesizing system to test the mode of action of chloroacetamides. *Weed Science*. 28: 334-340.
- DEMMIG-ADAMS, B. 1990. Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1020: 1-24.
- DeNOYELLES, F., KETTLE, W., D., SINN., D., E. 1982. The responses of plankton communities in experimental ponds to atrazine, the most heavily used pesticide in the United States. *Ecology*. 63: 1285-1293.
- DERBYSHIRE, E., WHITTON, B., A. 1968. A disc electrophoretic study of proteins of blue-green algae. *Phytochemistry*. 7: 1355-1360.
- De WEERD, FRANK, L., VAN STOKKUM, IVO, H., M., VAN AMERONGEN, HERBERT, DEKKER, JAN, P., VAN GRONDELLE, RIENK. 2002. Pathways for Energy Transfer in the Core Light-Harvesting Complexes CP43 and CP47 of Photosystem II. *Biophysical Journal*. 82: 1586-1597.
- DONNAN, L., JOHN, P., C., L. 1983. Cell cycle control by timer and sizer in *Chlamydomonas*. *Nature (London)*. 304: 630-633.
- DORIGO, URSULA, LEBOULANGER, CHRISTOPHE. 2001. A pulse-amplitude modulated fluorescence-based method for assessing the effects of photosystem II herbicides on freshwater periphyton. *Journal of Applied Phycology* 13: 509-515.
- DUKE, W., B., SLIFE, F., W., HANSON, J., B., BUTLER, H., S. 1975. An investigation on the mechanism of action of propachlor. *Weed Science*. 23: 142-147.
- EDREVA, AGLIKA. 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 106: 119-133.
- EDWARDS, R., OWEN, W. 1989. The comparative metabolism of the s-triazine herbicide atrazine and terbutryne in suspension cultures of potato and wheat. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 34: 246-254.
- EKLER, Z., DUTKA, F., STEPHENSON, G.R., 1993. Safener effects on acetolachlor toxicity, uptake, metabolism and glutathione-S-transferase activity in maize. *Weed Research*. 33: 311-318.
- EL-DIB, M., A., SHEHATA, A., ABOU-WALY, H., F. 1991. Response of freshwater algae (*Scenedesmus* sp.) to phenylurea herbicides. *Water, Air and Soil Pollution*. 55: 295-303.
- EL JAY, A., DUCRUET, J.-M., DUVAL, J.-C., PELLETIER, J., P. 1997. A high-sensitivity chlorophyll fluorescence assay for monitoring herbicide inhibition of photosystem II in the chlorophyte *Selenastrum capricornutum*: comparison with effect on cell growth. *Archives of Hydrobiology*. 140: 273-286.

- ENDO, T., SHIKANAI, T., TAKAHASHI, A., ASADA, K., SATO, F. 1999. The role of chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in photoprotection. *FEBS Letters*. 20: 5–8.
- EZRA, G., GRESSEL, J. 1982. Rapid effects of a thiocarbamate herbicide and its dichloroacetamide protectant on macromolecular synthesis and glutathione levels in maize cell cultures. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 17: 48-58.
- FAIRCHILD, J., F., LA POINT T., W., SCHWARTZ, T., R. 1994. Effects of an herbicide and insecticide mixture in aquatic organisms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 27: 527: 533.
- FAIRCHILD, J., F., RUESSLER, D., S., HAVERLAND, P., S., CARLSON, A., R. 1997. Comparative Sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to Sixteen Herbicides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 32: 353–357.
- FAIRCHILD, JAMES, F., RUESSLER, SHANE, D., CARLSON, RON. A. 1998. Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor and metolachlor. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 17 : 1830-1834.
- FALCONER, I., R. 1999. An overview of problems caused by toxic blue-green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Environmental. Toxicology*. 14: 5-12.
- FALK, S., SAMSON, G., BRUCE, D., HUNER, N., P., A., LAUDENBACH, D., E. 1995. Functional analysis of the iron-stress induced CP43' polypeptide of PS II in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Photosynthesis Research*. 45: 51–60.
- FARAGO, S., BRUNOLD, C., KREUZ, K. 1994. Herbicide safeners and glutathione metabolism. *Physiologia Plantarum*. 91 : 537-542.
- FAUST, M., ALTENBURGER, R., BÖDEKER, W., GRIMME, L., H. 1993. Additive effects of herbicides combination on aquatic non-target organisms. *The Science of the total Environment*. Supplement 1993: 942-952.
- FAUST, M., ALTENBURGER, R., BÖDEKER, W., GRIMME, L., H. 1994. Algal toxicity of binary combinations of pesticides. *Bulletin of Environmental contamination and Toxicology*. 53: 134-141.
- FAY, PETER, DeVASCONCELOS, LAURA. 1974. Nitrogen metabolism and ultrastructure in *Anabaena cylindrica*. II. The effect of molybdenum and vanadium. *Archives of Microbiology*. 99: 221-230.
- FEDTKE, C. 1981. Modes of herbicide action as determined with *Chlamydomonas reinhardtii* and Coulter counting. *American Chemical Society Symposium series*. 18: 231-250.

FIGUEROA, C., C., KOENIG, C., ARAYA, C., SANTOS, M., J., NIEMEYER, H., M. 1999. Effect of dimoba, a hydroxamic acid from cereals, on peroxisomal and mitochondrial enzymes from aphids: Evidence for the presence of peroxisomes in aphids. *Journal of Chemical Ecology*. 25:2465–2475.

FLORES, ENRIQUE, WOLK, PETER, C. 1986. Production, by filamentous, nitrogen-fixing cyanobacteria, of a bacteriocin and of other antibiotics that kill related strains. *Archives of Microbiology*. 145: 215-219.

FORCE, LESLEIGH, CRITCHLEY, CHRISTA, VAN RENSEN, JACK, J., S. 2003. New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. *Photosynthesis Research*. 78: 17-33.

FORK, D., C., MOHANTY, P. 1986. Fluorescence and other characteristics of blue-green algae (cyanobacteria), red algae, and cryptomonads. In: Govindjee, Ames, J. and Fork, D., C. (eds) *Light Emission by Plants and Bacteria*, pp 451-496. Academic Press, Orlando, Florida.

FORK, D., C., SATOH, K. 1986. The control by state transitions of the distributions of the excitation energy in photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology*. 37: 335–361.

FOYER, C., H., DESCOURVIERES, P., KUNERT, K., J. 1994a. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant and Cell Environment* 17: 507–523.

FOYER, C., H., LELANDAIS, M., KUNERT, K., J. 1994b. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*. 92: 696–717.

FOYER, C., NOCTOR, G., D. 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytologist*. 146: 359–388.

FRANKART, C., EULLAFROY, P., VERNET, G. 2003. Comparative effects of four herbicides on non-photochemical fluorescence quenching in *Lemna minor*. *Environmental and Experimental Botany*. 49: 159-168.

FRANQUEIRA, D., CID, A., TORRES, E., OROSA, M., HERRERO, C., 1999. A comparison of the relative sensitivity of structural and functional cellular responses in the alga *Chlamydomonas eugametos* exposed to the herbicide paraquat. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 36: 264–269.

FUERST, E., P., GRONWALD, J., W. 1986. Induction of rapid metabolism of metolachlor in sorghum (*sorghum bicolor*) shoots by CGA 92194 and other antidotes. *Weed Science*. 34: 354-361.

FUERST., E., P. 1987. Understanding the mode of action of chloroacetanilide and thiocarbamate herbicides. *Weed Technology*. 1 : 270–277.

- FUERST, E., P., LAMOUREUX, G., L., AHRENS, W., H. 1991. Mode of action of the dichloroacetamide antidote BAS 145-138 in corn. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 39: 138-148.
- FUJITA, Y., MURAKAMI, A. 1987. Regulation of electron transport composition in cyanobacterial photosynthetic system: stoichiometry among photosystem I and II complexes and their light harvesting antennae and cytochrome b6/f complex. *Plant and Cell Physiology*. 28: 1547-1553.
- FULDA, S., HAGEMANN, M. 1995. Salt treatment induces accumulation of flavodoxin in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Plant Physiology*. 146: 520-526.
- GAILLARD, C., DUFAUD, A., TOMMASINI, R., KREUZ, K., AMRHEIN, N., MARTINOLA, E. 1994. A herbicide antidote (safener) induces the activity of both the herbicide detoxifying enzyme and of a vacuolar transporter for the detoxified herbicide. *FEBS Letters*. 352: 219-221.
- GANTT, E. 1975. Phycobilisomes. Light harvesting pigment complexes. *Bioscience*. 25: 781-787.
- GANTT, E. 1981. Phycobilisomes. *Annual Review of Plant Physiology*. 32: 327-347.
- GANTT, ELISABETH. 1996. Pigment protein complexes and the concept of the photosynthetic unit: Chlorophyll complexes and phycobilisomes. *Photosynthesis Research*. 48: 47-53.
- GARRETT, REGINALD, H., GRISHAM, CHARLES, M. 2000. *Biochimie*. 2<sup>ème</sup> édition. DeBoeck Université. Paris. 1253pp.
- GENTY, B., BRIANTAIS, J.-M., BAKER, N., R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*. 990: 87-92.
- GENTY, B., HARBISON, J., BRIANTAIS, J.-M., BAKER, N., R. 1990. The relationship between non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and the rate of photosystem II photochemistry in leaves. *Photosynthesis Research*. 25: 249-257.
- GEOFFROY, LAURE, TESSEIRE, HENRI, COUDERCHET, MICHEL, VERNET, GUY. 2002. Effect of oxyfluorfen and diuron alone and in mixture on antioxidative enzymes of *Scenedesmus obliquus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 72: 178-185.
- GHADOUANI, ANAS, PINEL-ALLOUL, BERNADETTE, PREPAS, ELLIE, E. 2003. Effects of experimentally induced cyanobacterial blooms on crustacean zooplankton communities. *Freshwater Biology*. 48: 363-381.
- GIROTTI, A., W., KRISKA, T. 2004. Role of lipid hydroperoxides in photo-oxidative stress signaling. *Antioxidants and Redox Signaling*. 6: 301-310.

GIROUX, I., ROBERT, C., DASSYLVA, N. 2006. Présence de pesticides dans l'eau du Québec: Bilan dans des cours d'eau de zones en culture de maïs et de soya en 2002, 2003 et 2004 et dans les réseaux de distribution d'eau potable. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs. Direction du suivi de l'état de l'environnement. Direction des politiques de l'eau et Centre d'expertises en analyse environnementale du Québec. ISBN.2-550-46504-0, Envirodoq n° ENV/2006/013, collection n° QE/00173/57 pp.

GLAZER, A., N. 1989. Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *Journal of Biological Chemistry*. 264: 1-4.

GLEASON, F., K., PAULSON, J., L. 1984. Site of action of the natural algicide, cyanobacterin, in the blue-green alga, *Synechococcus* sp. *Archives of Microbiology*. 138: 273-277.

GONZALEZ-BARREIRO, OSCAR, RIOBOO, CARMEN, ANGELES, CID, HERRERO, CONCEPCION. 2004. Atrazine-induced chlorosis in *Synechococcus elongatus* cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 46: 301-307.

GRONWALD, J., W., FUERST, E., P., EBERLEIN, C., V., EGLI, M., A. 1987. Effect of herbicide antidotes on glutathione content and glutathione S-transferase activity of sorghum shoots. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 29: 66-76.

GROSSMAN, ARTHUR, R., SCHAEFER, MICHAEL, R., CHIANG, GISELA G., COLLIER, JACKIE. L. 1993. The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiological Reviews*. 57: 725-749.

GUASCH, H., SABATER, S. 1998. Light history influences the sensitivity to atrazine in periphytic algae. *Journal of Phycology*. 34: 233-241.

GUSTAVSON, KIM, WÄNGBERG, STEN-ÅKE. 1995. Tolerance induction and succession in microalgae communities exposed to copper and atrazine. *Aquatic Toxicology*. 32: 283-302.

HAAG, E., EATON-RYE, J., J., RENGEL, G., VERNMAS, W., F., J. 1993. Functionally important domains of the large hydrophilic loop of CP47 as probed by oligonucleotide-directed mutagenesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry*. 32 : 4444-4454.

HAGEMANN, M., JEANJEAN, R., FULDA, S., HAVAUX, M., JOSET, F., ERDMANN, N. 1999. Flavodoxin accumulation contributes to enhanced cyclic electron flow around photosystem I in salt-stressed cells of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Physiologia Plantarum*. 105: 670-678.

HALL, D., O., RAO, K., K. 1994. *Photosynthesis*. 5<sup>th</sup> edition. Cambridge University Press. 209 pp.

HAMALA, J., A., KOLLIG, H., P. 1985. The effects of atrazine on periphyton communities in controlled laboratory ecosystems. *Chemosphere*. 14: 1391-1408.

HAMILTON, R., H., MORELAND, D., E. 1962. Simazine: Degradation by corn seedlings. *Science (Washington, DC)*. 135 : 373-374.

HAMILTON, R., H., BANDURSKI, R., S., REUSCH, W., H. 1962. Isolation and characterization of a cyclic hydroxamate from *Zea mays*. Cereal Chemistry. 39 :107-113.

HAMILTON, R., H. 1964. Tolerance of several grass species to 2-chloro-triazine herbicides in relation to degradation and content of benzoxazinone derivatives. Agricultural and Food Chemistry. 12: 14-17.

HANKAMER, B., MORRIS, E., NIELD, J., CARNE, A., BARBER, J. 2001. Subunit positioning and transmembrane helix organisation in the core dimer of photosystem II. FEBS Letters. 504: 142-151.

HATFIELD, PEGGY, M., GUIKEMA, JAMES, A., ST. JOHN, JUDITH, B., GENDEP, STEVEN, M. 1989. Characterization of the adaptation response of *Anacystis nidulans* to growth in the presence of sublethal doses of herbicide. Current Microbiology. 18: 369- 374.

HATTON, P., J., DIXON, D., COLE, D., J., EDWARDS, R. 1996. *Glutathione transferase* activities and herbicide selectivity in maize and associated weed species. Pesticide Science, 46: 267-275.

HAVAUX, M., GUEDENEY, G., HAGEMANN, M., YEREMENKO, N., MATTIJS, H., C., P., JEANJEAN, R. 2005. The chlorophyll-binding protein IsiA is inducible by high light and protects the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 from photooxidative stress. FEBS Letters. 579: 2289-2293.

HEBER, U., EGNEUS, H., HANK, U., JENSEN, M., KOSTER, S. 1978. Regulation of photosynthetic electron transport and phosphorylation in intact chloroplasts and leaves of *Spinacia oleracea*. Planta. 143: 41-49.

HERBERT, S., K., FORK, D., C., MALKIN, S. 1990. Photoacoustic measurements *in vivo* of energy storage by cyclic electron flow in algae and higher plants. Plant Physiology. 194: 926-934.

HERMAN, D., KAUSHIK, N., K., SALOMON, K., R. 1986. Impact of atrazine on periphyton in freshwater enclosures and some ecological consequences. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science. 43: 1917-1925.

HIBINO, T., LEE, B., H., RAI, A., K., ISHIKAWA, H., KOJIMA, H., TAWADA, M., SHIMOYAMA, H., TAKABE, T. 1996. Salt enhances photosystem I content and cyclic electron flow via NAD(P)H dehydrogenase in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. Austrian Journal of Plant Physiology. 23 : 321-330.

HIDEG, E., KALAI, T., HIDEG, K., VASS, I. 1998. Photoinhibition of photosynthesis *in vivo* results in singlet oxygen production detection via nitroxide-induced fluorescence quenching in broad bean leaves. Biochemistry. 37: 11405-11411.

HIEBSCH, S. C. 1988. The occurrence of thirty-five pesticides in Canadian drinking water and surface water. Rapport inédit préparé pour la Direction de l'hygiène du milieu, Direction générale de la protection de la santé, ministère de la Santé nationale et du Bien-être social, Ottawa.

HIRAKI, MASAKI, VAN RENSEN, JACK, J., S., VREDENBERG, WIM, J., WAKABAYASHI, K. 2003. Characterization of the alterations of the chlorophyll *a* fluorescence induction curve after addition of Photosystem II inhibiting herbicides. *Photosynthesis Research* 78: 35–46.

HIRASE, KANGETSU, MOLIN, WILLIAM T. 2001. Effect of flurazone and other safeners for chloroacetanilide herbicides on *cysteine synthase* in sorghum shoots. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 71: 116–123.

HOAGLAND, K., D., DRENNER, J., D., SMITH, J., D., CROSS, D., R. 1993. Freshwater community responses to mixture of agriculture pesticides: effects of atrazine and bifenthrin. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 12: 622–637.

HOMMA, K., HASTINGS, J., W. 1989. Cell growth kinetics, division asymmetry and volume control at division in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*: a model of circadian clock control of the cell cycle. *Journal of Cell Science*. 92: 303–318.

HORTON, P., HAGUE, A. 1988. Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts. IV. Resolution of non-photochemical quenching. *Biochimica et Biophysica Acta*. 932 : 107–115.

HUBER, W. 1993. Ecotoxicological relevance of atrazine in aquatic systems. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 12:1865–1881.

HUDSON, R., J., M., MOREL, F., M., M. 1990. Iron transport in marine phytoplankton: kinetics of medium and cellular coordination reactions. *Limnology and Oceanography*. 35: 1002–1020.

IBELINGS, B., W., KROON, B., M., A., MUR, L., R. 1994. Acclimation of Photosystem-II in a cyanobacterium and a eukaryotic green-alga to high and fluctuating photosynthetic photon flux densities, simulating light regimes induced by mixing in lakes. *New Phytologist*. 128: 407–424.

IHALAINEN, J., A., D'HAENE, S., YEREMENKO, N., VAN ROON, H., ARTENI, A., A., BOEKEMA, E., J., VAN GRONDELLE, R., MATTHIJS, H., C., P., DEKKER, J., P. 2005. Aggregates of the chlorophyll-binding isiA (CP43') dissipate energy in cyanobacteria. *Biochemistry*. 44: 10846–10853.

IMLAY, J., A., LINN, S. 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*. 240: 1302–1309.

IVANOV, A., G., PARK, Y.-I., MISKIEWICZ, E., RAVEN, J., A., HUNER, N., P., A., ÖQUIST, G. 2000. Iron stress restricts photosynthetic intersystem electron transport in *Synechococcus* sp. PCC 7942. *FEBS Letters*. 485: 173–177.

IVANOV, ALEXANDER, G., KROL, MARIANNA, SVESHNIKOV, DMITRY, SELSTAM, EVA, SANDSTRÖM, STEFAN, KOOCHKEK, MARYAM, PARK, YOUN-IL, VASIL'EV, SERGEJ, BRUCE, DOUG, ÖQUIST, GUNNAR, HUNER, NORMAN, P., A. 2003. Iron deficiency in cyanobacteria causes monomerization of photosystem I trimers and reduces the capacity for state transitions and the effective absorption cross section of photosystem I *in vivo*. *Plant Physiology*. 141: 1436–1445.

JAGENDORF, A., T. 1962. Biochemistry of energy transformations during photosynthesis. In: Glass HB (ed) *Survey of Biological Progress*. Vol IV, pp 181–344. Academic Press, New York.

JAGENDORF, A., T., URIBE, E. 1966. ATP formation caused by acidbase transition of spinach chloroplasts. *Proc National Academy of Science of USA*. 55: 170–177.

JANSEN, M., A., K., PFISTER, K. 1990. Conserved kinetics at the reducing side of reaction-center II in photosynthetic organisms; changed kinetics in triazine-resistant weeds: *Z. Naturforsch.* 45c: 441–445.

JEANJEAN, R., MATTHIJS, H., C., P., ONANA, B., HAVAUX, M., JOSET, F. 1993. Exposure of the Cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 to salt-stress induction concerted changes in respiration and photosynthesis. *Plant and Cell Physiology*. 34: 1073–1079.

JEANJEAN, R., ZUTHER, E., YEREMENKO, N., HAVAUX, M., MATTHIJS, H., C., P., HAGEMANN, M. 2003. A photosystem I *psaFJ-null* mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 expresses the *isiAB* operon under iron replete conditions. *FEBS Letters*. 549: 52–56.

JIANG, F., HELLMAN, U., SORGA, G., E., BERGMAN, B., MANNERVIK, B. 1995. Cloning, sequencing, and regulation of glutathione reductase gene from cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *Journal of Biological Chemistry*. 270: 22882–22889.

JUNEAU, P., POPOVIC, R. 1999. Evidence for the rapid phytotoxicity and environmental stress evaluation using the PAM fluorometric method. *Ecotoxicology*. 8: 447–453.

JUNEAU, PHILIPPE, DEWEZ, DAVID, SABURO, MATSUI, SANG-KIL, KIM, POPOVIC, RADOVAN. 2001. Evaluation of different algal species sensitivity to mercury and metolachlor by PAM-fluoremetry. *Chemosphere*. 45: 589–598.

JUNEAU, P., GREEN, B., R., HARRISON P., J. 2005. Simulation of Pulse-Amplitude-Modulated (PAM) fluorescence: Limitations of some PAM-parameters in studying environmental stress effects. *Photosynthetica*. 43 :75–83.

JURSINIC, PAUL, STEMLER, ALLAN. 1983. Changes in <sup>14</sup>C atrazine binding associated with the oxidation-reduction state of the secondary quinone acceptor of photosystem II. *Plant Physiology*. 73: 703–708.



- KASAI, F., TAKAMURA, N., HATAKEYAMA, S. 1993. Effects of simetryne on growth of various freshwater algal taxa. *Environmental Pollution*. 79 : 77-83.
- KAUTSKY, H., HIRSCH, A. 1931. Neue Versuche zue kohlen säure-assimilation. *Naturwissenschaften*. 19: 964.
- KAWAMURA, M., MIMURO, M., FUJITA, Y. 1979. Quantitation relationship between two reaction centers in the photosynthetic system of blue-green algae. *Plant and Cell Physiology*. 20: 697-705.
- KEARNEY, P., KAUFMAN, D., SHEETS, T. 1965. Metabolites of simazine by *Asperillus fumigatus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 13: 369-372.
- KEREN, N., GONG, H., OHAD, I. 1995. Oscillations of reaction center II-D1 protein degradation in vivo induced by repetitive light flashes. Correlation between the level of RCII-Q<sub>B</sub> and protein degradation in low light. *Journal of Biological Chemistry*. 270: 806-814.
- KETCHERSID, M., L., VIETER, D., M., MERKLE, M., G. 1982. CGA-43089 effects on metolachlor uptake and membrane permeability in grain sorghum (*Sorghum bicolor*). *Journal of Plant Growth Regulation*. 1 : 285-294.
- KIM, S.-J., LEE, C.-H., HOPE, A., B., CHOW, W., S. 2001. Inhibition of photosystem I and II and enhanced back flow of photosystem I electrons in cucumber leaf discs chilled in the light. *Plant and Cell Physiology*. 42: 842-848.
- KRAUSE, G., H., BEHREND, U. 1986. ApH-dependent chlorophyll fluorescence quenching indicates a mechanism of protection against photoinhibition of chloroplasts. *FEBS Letters*. 200: 298-302.
- KRAUSE, G., H., WEIS, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42: 313-348.
- KRAUSE, HEINRICH, G., JAHNS, PETER. 2001. Pulse Amplitude Modulated Chlorophyll Fluorometry and its Application in Plant Science. Chapter 13. Beverley Green and William Parson (eds). Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 373-399.
- KRIEGER, A., MOYA, L., WEIS E. 1992. Energy-dependent quenching of chlorophyll *a* fluorescence: effect of pH on stationary fluorescence and picosecond-relaxation kinetics in thylakoid membranes and Photosystem II preparations. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1102: 167-176.
- KRIEGER-LISZKAY, ANJA, RUTHERFORD, WILLIAM, A. 1998. Influence of herbicide binding on the redox potentiel of the quinone acceptor in photosystem II: Relevance to photodamage and phytotoxicity. *Biochemistry*. 37: 17339-17344.
- LAM, CATHERINE, W., Y., SILVESTER, WARWICK, B. 1979. Growth interactions among blue-green (*Anabaena oscillarioides*, *Microcystis aeruginosa*) and green (*Chlorella sp.*) algae. *Hydrobiologia*. 63 : 135-143.

- LAMOUREUX, G., L., SHIMABUKURO, R., H., SWANSON, H., FREAR, D. 1970. Metabolism of 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine (atrazine) in excised sorghum leaf section. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 18: 81-86.
- LAMOUREUX, G., L., RUSNESS, D., G. 1992. The mechanisms of action of BAS 145 138 as a safener for chloimuron ethyl, glucoside conjugation and acetolacetate synthase. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 42 :128-139.
- LANG, N., J., SIMON, R., D., WOLK, C., P. 1972. Correspondence of cyanophycin granules with structured granules in *Anabaena cylindrica*. *Archives of Microbiology*. 83: 313-320.
- LARSON, S., J., GILLIOM, R., J., CAPEL, P., T. 1999. Pesticides in streams of the United States: Initial results from the National Water-Quality Assessment Program, U.S. Geological Survey, Water-Resources Investigations report 98-4222, 99 p:  
<http://ca.water.usgs.gov/pnsp/rep/wrir984222/> Consultation 20/07/2007.
- LAY, M., M., CASIDA, J., E. 1976. Dichloroacetamide antidotes enhance thiocarbamate sulfoxide detoxication by elevating corn root glutathione content and glutathione-S-transferase activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 6: 442-456.
- LAZAR, DUSAN. 2003. Chlorophyll a fluorescence rise induced by high light illumination of dark-adapted plant tissue studied by means of a model of photosystem II and considering photosystem II heterogeneity. *Journal of Theoretical Biology*. 2003. 220: 469-503.
- LEDFORD, HEIDI, K., NIYOGI, KRISHNA, K. 2005. Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant, Cell and Environment*. 28: 1037-1045.
- LENDZIAN, FRIEDHELM, BITTL, ROBERT, TELFER, ALISON, LUBITZ, WOLFGANG. 2003. Hyperfine structure of the photoexcited triplet state 3P680 in plant PS II reaction centres as determined by pulse ENDOR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica. Acta*. 1605: 35- 46.
- LESZCZYNSKI, B., DIXON, A., F., G., BAKOWSKI, T., MATOK., H. 1995. Cereál allelochemicals in graain aphid control. *Allelopathy Journal*. 2: 31-36.
- LOCKERT, C., K., HOAGLAND, K., D., SIEGFRIED, B., D. 2006. Comparative sensitivity of freshwater algae to atrazine. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 76: 73-79.
- LONNEBORG, A., LUND, L., K., KALIA, S., R., GUSTAFSSON, P., OQUIST, G. 1985. Acclimation processes in the light-harvesting system of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* following a light shift from white to red. *Plant Physiology*. 78:110-114.
- LORENZEN, C., J. 1967. Determination of chlorophyll and pheopigments: Spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography*. 12: 343-346.
- LÜRLING, MIQUEL, ROESSINK, IVO. 2006. On the way to cyanobacterial blooms: Impact of the herbicide metribuzin on the competition between a green alga (*Scenedesmus*) and a cyanobacterium (*Microcystis*). *Chemosphere*. 65: 618-626.

MacCOLL, R., LEE, J., J., BERNIS, D., S. 1971. Protein aggregation in C-phycocyanin. Studies at very low concentrations with the photoelectric scanner of the ultracentrifuge. *Biochemical Journal*. 122: 421-426.

MACIAS, FRANCISCO, A., MARIN, DAVID, OLIVEROS-BASTIDAS, ALBERTO, CASTELLANO, DIEGO, SIMONET, ANA, M., MOLINILLO, JOSÉ, M., G. 2005. Structure-Activity relationships (SAR) studies of benzoxazinones, their degradation products and analogues. Phytotoxicity on standard target species (STS). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 53: 538-548.

MAGUIRE, R., J., TKACZ, R., J. 1993. Occurrence of pesticides in the Yamaska River, Quebec. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 25: 220-226.

MAKINO, AMANE, MIYAKE, CHIKAHIRO, YOKOTA, AKIHO. 2002. Physiological functions of the water-water cycle (Mehler reaction) and the cyclic electron flow around PSI in rice leaves. *Plant and Cell Physiology*. 43: 1017-1026.

MALANGA, GABRIELA, PUNTARULO, SUSANA. 1995. Oxidative stress and antioxidant content in *Chlorella vulgaris* after exposure to ultraviolet-B radiation. *Physiologia Plantarum*. 94: 672-679.

MALKIN, S., HERBERT, S., K., FORK, D., C. 1990. Light distribution, transfer and utilization in the marine red alga *Porphyra perforata* from photoacoustic energy storage measurements. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1016: 177-189.

MANN, J., D., JORDAN, L., S., DAY, B., E. 1965. A survey of herbicides for their effect upon protein synthesis. *Plant Physiology*. 40: 840-843.

MANODORI, A., ALHADEFF, M., GLAZER, A., N., MELIS, A. 1984. Photochemical apparatus organization in *Synechococcus* 6301 (*Anacystis nidulans*). Effect of phycobilisome mutation. *Archives of Microbiology*. 139: 117-123.

MANODORI A, MELIS A. 1985. Phycobilisome-photosystem II association in *Synechococcus* 6301 (Cyanophyceae). *FEBS Letters*. 181: 79-82.

MANODORI, A., MELIS, A. 1986. Cyanobacterial acclimation to photosystem I or photosystem II light. *Plant Physiology*. 82: 185-189.

MARCACCI, SYLVIE. 2004. A phytoremediation approach to remove pesticides (atrazine and lindane) from contaminated environment. Thèse no 2950. École Polytechnique Fédérale de Lausanne. Lausanne.

MARTIN, J., D., CRAWFORD, C., LARSON, S., J. 2003. Pesticides in Streams: Summary statistics; Preliminary results from Cycle 1 of the National Water Quality Assessment Program (NAWQA) 1992-2001. Web site: US Geological Survey. [http://ca.water.usgs.gov/pnsp/pestsw/Pest-SW\\_2001\\_Text.html](http://ca.water.usgs.gov/pnsp/pestsw/Pest-SW_2001_Text.html) Consultation 12/07/2007.

MARWOOD, C., A., SMITH, R., E., H., SOLOMON, K., R., CHARLTON, M., N., GREENBERG., B., M. 1999. Intact and photomodified polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit photosynthesis in natural assemblages of Lake Erie phytoplankton exposed to solar radiation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 44: 322-327.

MASON, C., P., EDWARDS, K., R., CARLSON, R., E., PIGNATELLO, J., GLEASON, F., K., WOOD, J., M. 1982. Isolation of chlorine-containing antibiotic from the freshwater cyanobacterium *Scytonema hofmanni*. *Science*. 215: 400-402.

MATTHES, BERND, BÖGER, PETER. 2002. Chloroacetamides affect plasma membrane. *Z Naturforsch.* 57c : 843-852.

MAXWELL, KATE, JOHNSON, GILES, N. 2000. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. 51: 659-668.

McRAE, B. 1989, révisé en 1991. Backgrounder: the characterization and identification of potentially leachable pesticides and areas vulnerable to ground-water contamination by pesticides in Canada. Direction générale des pesticides, Agriculture Canada.

MEHLER, A., H. 1957. Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 33: 65-77.

MELIS, A., HARVEY, G., W. 1981. Regulation of photosystem stoichiometry, chlorophyll a and chlorophyll b content and relation to chloroplast ultrastructure. *Biochimica and Biophysica Acta*. 637: 138-145.

MELLIS, J., M., PILLAI, P., DAVIS, D., E., TRUELOVE, B. 1982. Metolachlor and alachlor effects on membrane permeability and lipid synthesis. *Weed Science*. 30: 399-404.

MICHEL, K.-P., PISTORIUS, E., K. 2004. Adaptation of the photosynthetic electron transport chain in cyanobacteria to iron deficiency: the function of IdiA and IsiA. *Physiologia Plantarum*. 120: 36-50.

MILHOME, H., BATSIDE, J. 1990. Uptake and phytotoxicity of the herbicide metsulfuron methyl in corn root tissues in the presence of the safener 1,8-naphthalic anhydride. *Plant Physiology*. 93 : 730-738.

MILLER, L., HOLT, S. 1977. Effect of carbon dioxide on pigment and membrane content in *Synechococcus lividus*. *Archives of Microbiology*. 115: 185-198.

MILLER, A., G., ESPIE, G., S., CANVIN, D., T. 1991. The effects of inorganic carbon and oxygen on fluorescence in the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625. *Canadian Journal of Botany*. 69: 1151-1160.

MILLER, KEITH, D., IRZYK, GERARD, P., FUERST, PATRICK, E. 1994. Benoxacor treatment increases glutathione S-transferase activity in suspension culture of *Zea mays*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 48: 123-134.

MILLER, KEITH, D., IRZYK, GERARD, P., FUERST, PATRICK, E., MCFARLAND, JANIS, E., BARRINGER, MICHAEL, CRUZ, SHAWN, EBERLE, WILLIAM, J., FÖRY, WERNER. 1996. Identification of metabolites of the herbicide safener Benoxacor isolated from suspension-cultured *Zea mays* cells 3 and 24 h after treatment. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 44 : 3335-3341.

MIMURO, M., FUJITA, Y. 1977. Estimation of chlorophyll a distribution in the photosynthetic pigment systems I and II of the blue-green alga *Anabaena variabilis*. *Biochimica and Biophysica Acta*. 459: 376-389.

MINISTÈRE DU DÉVELOPPEMENT DURABLE, DE L'ENVIRONNEMENT ET DES PARCS DU QUÉBEC. 2002. L'utilisation des pesticides dans le maïs et le soya. Site : [http://www.menv.gouv.qc.ca/pesticides/maïs\\_soya/](http://www.menv.gouv.qc.ca/pesticides/maïs_soya/)

MINISTÈRE DU DÉVELOPPEMENT DURABLE, DE L'ENVIRONNEMENT ET DES PARCS DU QUÉBEC. 2005. Critères de qualité de l'eau de surface au Québec. Mise à jour 2004. Site : [http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/criteres\\_eau/index.htm](http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/criteres_eau/index.htm)  
<http://pubs.acs.org/hotartcl/est/99/apr/test.html>

MISHRA, N., P., GHANOTAKIS, D., F. 1994. Exposure of a photosystem-II complex to chemically generated singlet oxygen results in D1 fragments similar to the ones observed during aerobic photoinhibition. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1187: 296–300.

MITCHELL, P. 1961 Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* (London) 191: 144–148.

MITTLER, RON, VANDERAUWERA, SANDY, GOLLERY, MARTIN, VAN BREUSEGEM, FRANK. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*. 9: 490-498.

MIYAKE, C., YOKOTA, A. 2001. Cyclic flow of electrons within PSII in thylakoid membranes. *Plant and Cell Physiology*. 42: 508–515.

MOAN, J. 1990. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 6: 343–347.

MORELAND, D., E., MALHOTRA, S., S., GRUENHAGEN, R., D., SHOKRAIL, E., H. 1969. Effects of herbicides on RNA and protein synthesis. *Weed Science*. 17: 556-563.

MOZER, T., J., TIEMEIER, D., C., JAWORSKI, E., G. 1983. Purification and characterization of corn glutathione S-transferase? *Biochemistry*. 22 : 1068-1072.

MÜLLER, PATRICIA, LI, XIAO-PING, NIYOGI, KRISHNA, K. 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant physiology*. 125: 1558-1566.



MURAKAMI, A., FUJITA, Y. 1988. Steady state of photosynthesis in cyanobacterial photosynthetic systems before and after regulation of electron transport composition: overall rate of photosynthesis and PSI/PSII composition. *Plant and Cell Physiology*. 29: 305-311.

NICOLAUS, B., SANDMANN, G., WATANABE, H., WAKABASYASHI, K., BÖGER, P. 1989. Herbicides-induced peroxidation: influence of light and diuron on protoporphyrin IX formation. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 35: 192-201.

NIEMEYER, H., M. 1988. Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the *Gramineae*. *Phytochemistry*. 27: 3349-3358.

NILSSON, E., SIMPSON, D., J., JANSSON, C., ANDERSSON, B. 1992 Ultrastructural and biochemical characterization of a *Synechocystis* 6803 mutant with inactivated *psbA* genes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 295: 340-347.

NISHIYAMA, Y., ALLAKHVERDIEV, S., I., YAMAMOTO, H., HAYASHI, H., MURATA, N. 2004. Singlet oxygen inhibits the repair of photosystem II by suppressing the translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry*. 43: 11321-11330.

NIYOGI, K.K., 1999. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50: 333-359.

NOCTOR, G., HORTON, P. 1990. Uncoupler titration of energy-dependent chlorophyll fluorescence quenching and Photosystem II photochemical yield in intact pea chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1016: 219-227.

NOGUCHI, T. 2002. Dual role of triplet localization on the accessory chlorophyll in the photosystem II reaction center: photoprotection and photodamage of the D1 protein. *Plant and Cell Physiology*. 43: 1112-1116.

NUSCH, E., A. 1980. Comparison of methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Archives of Hydrobiology Beih., Ergebn. Limnology* 14: 14-36.

OETTMEIER, W., MASSON, K., FEDTKE, C., KONZE, J., SCHMIDT, R., R. 1982. Effect of different Photosystem II inhibitors on chloroplasts isolated from species either susceptible or resistant toward s-triazine herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 18: 357-367.

OQUIST, G. 1974a. Distribution of chlorophyll between the two photoreactions in photosynthesis of the blue-green alga *Anacystis nidulans* grown at two different light intensities. *Physiologia Plantarum*. 30: 38-40.

OQUIST, G. 1974b. Light-induced changes in pigment composition of photosynthetic lamellae and cell-free extracts obtained from the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Physiologia Plantarum*. 30: 45-48.

ÖQUIST, G. 1974c. Iron deficiency in the blue-green alga *Anacystis nidulans*: changes in pigmentation and photosynthesis. *Physiologia Plantarum*. 30: 30-37.

- ÖQUIST, G. 1974d. Iron deficiency in the blue-green alga *Anacystis nidulans*: fluorescence and absorption spectra recorded at 77K. *Physiologia Plantarum*. 31: 55–58.
- OSMOND, C., B., GRACE, S., C. 1995. Perspective on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? *Journal of Experimental Botany*. 48: 1351–1362.
- OSMOND, B., BADGER, M., MAXWELL, K., BJÖRKMAN, O., LEEGOOD, R. 1997. Too many photons: photorespiration, photoinhibition and photooxidation. *Trends in Plant Science*. 2: 119–121.
- OSTROVIDOV, SERGE, FRANCK, PATRICIA, JOSEPH, DELPHINE, MARTARELLO, LAURENT, KIRSCH, GILBERT, BELLEVILLE, FRANCINE, NABET, PIERRE, DOUSSET, BRIGITTE. 2000. Screening of new antioxidant molecules using flow cytometry. *Journal of Medicinal Chemistry*. 43: 1762–1769.
- OTSUKA, SHIGETO, SUDA, SHOICHIRO, LI, RENHUI, WATANABE, MASAYUKI, OYAIZU, HIROSHI, HIROKI, MIKIYA, MAHAKHANT, APARAT, LIU, YONGDING, MATSUMOTO, SATOSHI, WATANABE, MAKOTO, M. 1998. Phycoerythrin-containing *Microcystis* isolated from P.R. China and Thailand. *Phycological Research*. 46: 45–50.
- PAKRASI, H., B., REITHMAN, H., C., SHERMAN, L., A. 1985a. Organization of pigment proteins in the Photosystem II complex of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Proc National Academy of Science of USA*. 82: 6903–6907.
- PAKRASI, H., B., GOLDENBERG, A., SHERMAN, L., A. 1985b. Membrane development in the cyanobacterium, *Anacystis nidulans*, during recovery from iron starvation. *Plant Physiology*. 79: 290–295.
- PALLET, K., E., DODGE, A., D. 1980. Studies into the action of some photosynthetic inhibitor herbicides. *Journal of Experimental Botany*. 31: 1051–1066.
- PARK, Y.-I., SANDSTRÖM, S., GUSTAFSSON, P., ÖQUIST, G. 1999. Expression of the *isiA* gene is essential for the survival of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 by protecting photosystem II from excess light under iron limitation. *Molecular Microbiology*. 32: 123–129.
- PFISTER, K., RADOSEVICH, S., R., ARNTZEN, C., J. 1979. Modifications of herbicide binding to photosystem II in two biotypes of *Senecio vulgaris* L. *Plant Physiology*. 64: 995–999.
- PFLUGMACHER, S., SCHRÖDER, P., SANDERMANN, H. 2000. Taxonomic distribution of plant *glutathione-S-transferases* acting on xenobiotics. *Phytochemistry*. 54: 267–273.
- POSPISIL, P. 1997. Mechanisms of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in higher plants. *Photosynthetica*. 34: 343–355.

- RAVETON, M., RAVANEL, P., KAOUADJI, M., BASTIDE, J., TISSUT, M. 1997. The chemical transformation of atrazine in corn seedlings. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 58: 199-208.
- RENNENBERG, H., BIRK, C., SCHAER, B. 1982. Effect of N,N-diallyl-2,2-dichloroacetamide (R25788) on efflux and synthesis of glutathione in tobacco suspension cultures. *Phytochemistry*. 21: 5-8.
- RIOBOO, C., GONZALEZ, O., HERRERO, C., CID, A. 2002. Physiological response of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to triazine and phenylurea herbicides. *Aquatic Toxicology*. 59: 225-235.
- ROMERO, J., M., LARA, C., SIVAK, M., N. 1992. Effect of carbon and nitrogen assimilation on chlorophyll fluorescence emission by the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Physiologia Plantarum*. 85: 433-438.
- RUBAN, A., V., REES, D., PASCAL, A., A., HORTON, P. 1992. Mechanism of  $\Delta pH$ -dependent dissipation of absorbed excitation energy by photosynthetic membranes. II. The relationship between LHClI aggregation in vitro and qE in isolated thylakoids. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1102: 39-44.
- RUBIN, B., KIRINO, O., CASIDA, J., E. 1985. Chemistry and action of N-phenylmaleamic acids and their progenitors as selective antidotes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 33: 489-494.
- RUNES, H., B., BOTTOMLEY, P., J., LERCH, R., N., JENKINS, J., J. 2001. Atrazine remediation in wetland microcosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20: 1059-1066.
- RUTHERFORD, WILLIAM, A., KRIEGER-LISZKAY, ANJA. 2001. Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends in Biochemical Sciences*. 26: 648-653.
- SANDSTRÖM, S., PARK, Y.-I., ÖQUIST, G., GUSTAFSSON, P. 2001. CP43', the *isiA* gene product, functions as an energy dissipator in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Photochemistry and Photobiology*. 74: 431-437.
- SANDSTRÖM, S., IVANOV, A., G., PARK, Y.-I., ÖQUIST, G., GUSTAFSSON, P. 2002. Iron stress responses in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Physiologia Plantarum*. 116: 255-263.
- SANTÉ CANADA. 1986. Le métolachlore. Site du Santé de l'environnement et du milieu du travail. Site :[http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/doc\\_sup-appui/metolachlor-metolachlore/index\\_f.html](http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/doc_sup-appui/metolachlor-metolachlore/index_f.html)
- SAUER, JORG, SCHREIBER, ULRICH, SCHMID, ROLAND, VOLKER, UWE, FORCHHAMMER, KARL. 2001. Nitrogen starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942. Low-level photosynthesis as a mechanism of long-term survival. *Plant Physiology*. 126: 233-243.



SCHMID, G., H., LEHMANN-KIRK, U. 1977. Photooxidation reactions of diphenylcarbazine and their DCMU-sensitivity in thylakoids of the blue-green alga *Oscillatoria chalybea*. Archives of Microbiology. 115: 265-269.

SCHUBERT, H., MATTHIJS, H., C., P., MUR, L., R., SCHIEWER, U. 1995. Blooming of cyanobacteria in turbulent water with steep light gradients: the effect of intermittent light and dark periods on the oxygen evolution capacity of *Synechocystis* sp. PCC 6803. FEMS Microbiological. Ecology. 18: 237-245.

SCHREIBER, U. 1983. Technical review. Chlorophyll fluorescence yield changes as a tool in plant physiology. I. The measuring system. Photosynthesis Research 4: 361-373.

SCHREIBER, U., SCHLIWA, U., BILGER, W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosynthesis Research. 10: 51-62.

SCHREIBER, U., NEUBAUER, C. 1990. O<sub>2</sub>-dependant electron flow, membrane energization and the mechanism of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. Photosynthesis Research. 25: 279-293.

SCHREIBER, U., BILGER, W., NEUBAUER, C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. In: Schulze, E.D., Caldwell, M.M. (Eds.), Ecophysiology of Photosynthesis. Ecological Studies. Springer., Berlin. 49-70.

SCHULZ, M., FRIEBE, A., KUECK, P., SEIPEL, M., SCHNABL, H. 1994. Allelopathic effects of living quack grass (*Agropyron repens* L.). Identification of inhibitory allelochemicals exuded from rhizome borne roots. Angew. Botanica. 68 : 195-200.

SEGUIN, F., LEBOULANGER, C., RIMET, F., DRUART, J., C., BÉRARD, A. 2001. Effects of atrazine and nicosulfuron on phytoplankton in systems of increasing complexity. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 40: 198-208.

SENDERSKY, E., LAHMI, R., SHALTIEL, J., PERELMAN, A., SCHWARZ, R., 2005. Nblc, a novel component required for pigment degradation during starvation in *Synechococcus* PCC 7942. Molecular Microbiology. 58: 659-668.

SENJE, LIN, GOBLER, CHRISTOPHER, J., CARPENTER, EDWARD, J. 2001. Cytological and biochemical responses of *Dunaliella tertiolecta* (Volvocales, Chlorophyta) to iron stress. Phycologia. 40: 403-410.

SHIMABUKURO, R. 1968. Atrazine metabolism in resistant corn and sorghum. Plant Physiology. 43: 1925-1930.

SHIMABUKURO, R., H., SWANSON, H., WALSH, W., C. 1970. Glutathione conjugation: Atrazine detoxication mechanism in corn. Plant Physiology. 46: 103-107.

SHIMABUKURO, R., FREAR, D., SWANSON, H., WALSH, W. 1971. Glutathione conjugation: an enzymatic basis for atrazine resistance. Plant Physiology. 47: 10-14.

SHIMABUKURO, M., A, SHIMABUKURO, R., H., WALSH, W., C. 1982. The antagonism of IAA-induced hydrogen ion extrusion and coleoptile growth by diclofop-methyl. *Physiologia Plantarum*. 56: 444-452.

SHIMABUKURO, RICHARD, H., WALSH, WENDY, C., HOERAUF, ROLAND, A. 1986. Reciprocal antagonism between the herbicides, diclofop-methyl and 2,4-D, in corn and soybean tissue culture. *Plant Physiology*. 80: 612-617.

SHLEGEL, I., DOAN, N., T., DE CHAZAL, N., SMITH, G., D. 1998. Antibiotic activity of cyanobacterial isolates from Australia and Asia against green algae and cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology*. 10: 471-479.

SIMON, ROBERT, D. 1973. Measurement of the cyanophycin granule polypeptide contained in the blue-green algae *Anabaena cylindrica*. *Journal of Bacteriology*. 114: 1213-1216.

SIMONTACHI, M., CARO, A., FRAGA, C., G., PUNTARULO, S. 1993. Oxidative stress affects  $\alpha$ -tocopherol content in soybean embryonic axes upon inhibition and following germination. *Plant Physiology*. 102: 949-953.

SINGH, H., N., SINGH, H., R., VAISHAMPAYAN, A. 1979. Toxic and mutagenic action of the herbicide alachlor (lasso) on various strains of the nitrogen-fixing blue-green alga *Nostoc muscorum* and characterization of the herbicide-induced mutants resistant to methylamine and L-methionine-DL-sulfoximine. *Environmental and Experimental Botany*. 19: 5-12.

SIX, CHRISTOPHE, JOUBIN, LUDOVIC, PARTENSKY, FRÉDÉRIC, HOLTZENDORFF, JULIA, GARCZAREK, LAURENCE. 2007. UV-induced phycobilisome dismantling in the marine picocyanobacterium *Synechococcus* sp. WH8102. 2007. *Photosynthesis Research*. 92:75-86.

SLOOTEN, L., VAN MONTAGU, M., INZE, D., 1998. Manipulation of oxidative stress tolerance in transgenic plants. In: Lindsey, K. (Ed.), *Transgenic Plant Research*. Harwood Academic Publishers, Chur, pp. 241-262.

SPAWN, REBECCA, L., HOAGLAND, KYLE, D., SIEGFRIED, BLAIR, D. 1997. Effects of alachlor on an algal community from a midwestern agricultural stream. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 16: 785-793.

STATISTIQUE CANADA. 1996. Recensement de l'agriculture 1996.

STATISTIQUE CANADA. 2001. Recensement de l'agriculture 2001.

STEIN, J. 1973. (Ed.) *Handbook of Phycological methods. Culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press. 448 pp.

STRASSER, BRUNO, STRASSER, RETO, J. 1995. Measuring fast fluorescence transients to assess environmental questions: The JIP-test. Photosynthesis: from Light to Biosphere. Volume V: 977-980. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.

STRATTON, G., W., HUBER, A., L., CORKE, C., T. 1979. Effect of mercuric ion on the growth, photosynthesis and nitrogenase activity of *Anabaena inaequalis*. Applied Environmental Microbiology 38 : 537.

STRATTON, G., W. 1984. Effects of the herbicide atrazine and its degradation products, alone and in combination, on phototrophic microorganisms. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 13: 35-42.

SUGINAKA, K., YAMAMOTO, K., ASHIDA, H., KONO, Y., SAWA, Y., SHIBATA, H. 1998. Cysteine uptake for accumulation of glutathione by the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 62: 424-428.

SUNDA, W., G., HUNTSMAN, S., A. 1995. Iron uptake and growth limitation in oceanic and coastal phytoplankton. Marine Chemistry. 50: 189-206.

SUNDBERG, B., CAMPBELL, D., PALMQVIST, K. 1997. Predicting CO<sub>2</sub> gain and photosynthetic light acclimation from fluorescence yield and quenching in cyano-lichens. Planta. 201: 138-145.

SUROSZ, W., PALINSKA, K., A. 2004. Effects of heavy-metal stress on cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 48: 40-48.

SYNGENTA CANADA. Site : <http://www.syngenta.ca/en/>. Consulté 07/05/2007.

SYNGENTA. Site : <http://www.syngenta.ca/fr/prod/>

TAKAHASHI, M., ASADA, K. 1982. Dependence of oxygen-affinity for Mehler reaction on photochemical activity of chloroplast thylakoids. Plant and Cell Physiology. 23: 1457 - 1461.

TANDEAU DE MARSAC, N., COHEN-BAZIRE, G. 1977. Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. Proc. National Academy of Science of USA. 74: 1635-1639.

TANG, J., X., HOAGLAND, K., D., SIEGFRIED, B., D. 1997. Differential toxicity of atrazine to selected freshwater algae. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 59 : 631-637.

TANG, J., HOAGLAND, K., D., SIEGFRIED, B., D. 1998. Uptake and bioconcentration of atrazine by selected freshwater algae. Environmental Toxicology and Chemistry. 17: 1085-1090.

TANG, JIXIN, SIEGFRIED, BLAIR, KYLE, D., HOAGLAND, D. 1998. Glutathione-S-Transferase and *in Vitro* Metabolism of Atrazine in Freshwater Algae. Pesticide Biochemistry and Physiology. 59: 155-161.

- TEISSEIRE, H, VERNET., G. 2000. Is the «diuron effect» due to a herbicide strengthening of antioxidative defenses of *Lemna minor*? Pesticide Biochemistry and Physiology. 66: 153-160.
- TEL-OR, E., HUFLEJT, M., PACKER, L. 1985. The role of glutathione and ascorbate in hydroperoxide removal in cyanobacteria. Biochemical and Biophysical Research Communications. 132: 533-539.
- THOMPSON, D., G., HOLMES, S., B., THOMAS, D., MACDONALD, L., SOLOMON, K., R. 1993. Impact of hexazinone and metsulfuron methyl on the phytoplankton community of a mixed-wood/boreal forest lake. Environmental Toxicology and Chemistry 12: 1695–1707.
- THOMPSON, H. 1996. Interactions between pesticides : a review of reported effects and their implications for wildlife risk assessment. Ecotoxicology. 5: 59-81.
- TIPTON, C., L., HUSTED, R., R., TSAO, F., H.,-C. 1971. Catalysis of simazine hydrolysis by 2,4-dihydroxy-7-méthoxy-1,4-benzoxazin-3-one. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 18: 484-486.
- TOMLIN, C. 1995. The pesticide manual, a world compendium. Incorporating the agrochemicals handbook, 10th ed. C. Tomlin editor. British Crop Protection Council.
- VAN GORKOM, H., J., DONZE, M. 1971. Localization of nitrogen fixation in *Anabaena*. Nature (London). 234: 231-232.
- VAN HEERDEN, PHILIPPUS, D., R., STRASSER, RETO, J., KRÜGER, GERT, H., J. 2004. Reduction of dark chilling stress in N<sub>2</sub>-fixing soybean by nitrate as indicated by chlorophyll a fluorescence kinetics. Physiologia Plantarum. 121: 239-249.
- VAN KOOTEN, O., ROSENQUIST, M . 2003. Applications of chlorophyll fluorescence in ecotoxicology: Heavy metals, herbicides, and air pollutants. Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology. DeEll, J., R., P. M. A. Toivonen. Kluwer Academic Publishers: pp. 31-77.
- VAN MIEGHEM, F., BRETTEL, K., HILLMANN, B., KAMLOWSKI A., RUTHERFORD, A., W., SCHLODDER, E. 1996. Charge recombination reactions in photosystem II. 1. Yields, recombination pathways, and kinetics of the primary pair. Biochemistry. 34: 4798–4813.
- VAN RENSEN, J., J., S., RODRIGUES, G., C., VREDENBERG., W., J. 2001. Analysis of electron flow around Photosystem II in atrazine-resistant plants applying the three-state energy trapping model on the OJIP fluorescence induction curve. In: PS2001 Proceedings 12<sup>th</sup> International Congress on Photosynthesis, Brisbane, Australia ([www.publish.csiro.au/PS2001](http://www.publish.csiro.au/PS2001))
- VASILEVA, V., E., LEVITIN, M., G. 1974. Effect of carbon dioxide starvation on certain blue-green algae. Soy. Plant Physiology. 21 : 999-1002
- VERNOTTE, C., PICAND, M., KIRILOVSKY, D., OLIVE, J., AJLANI, G., ASTIER, C. 1992. Changes in the photosynthetic apparatus in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6714 following light-to-dark and dark-to-light transitions. Photosynthesis Research. 32: 45-57.

- WEINER, JEANNETTE A., DeLORENZO MARIE, E., FULTON, MICHAEL, H. 2004. Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species. *Aquatic Toxicology*. 68: 121-128.
- WEISSHAAR, HANS, BÖGER, PETER. 1987. Primary effects of chloroacetamides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 28: 286-293.
- WEISSHARR, HANS, RETZLAFF, G., BÖGER, PETER. 1988. Chloroacetamide inhibition of fatty acid synthesis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 32: 212-216.
- WENGER, K., BIGLER, L., SUTER, M., J.-F., SCHÖNENBERGER, R., GUPTA, S., K., SCHULIN, R. 2005. Effect of corn root exudates on the degradation of atrazine and its chlorinated metabolites in soils. *Journal of Environmental Quality*. 34: 2187-2196.
- WILHELM, C., WILD, A. 1984. The variability of the photosynthetic unit in *Chlorella*. The effect of light intensity and cell development on photosynthesis, P-700 and cytochrome *f* in homocontinuous and synchronous cultures of *Chlorella*. *Journal of Plant Physiology*. 115: 125-135.
- WILKES, M., A., MARSHALL, D., R., COPELAND, L. 1999. Hydroxamic acids in cereal roots inhibit the growth of take-all. *Soil Biology and Biochemistry*. 31: 1931-1836.
- WILKINSON, R., E. 1982. Alachlor influence on sorghum growth and gibberellin biosynthesis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 17: 177-184.
- WINTERMANS, J., F., G., M., DE MOTTS, A. 1965. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls *a* and *b* and their phaeophytins in ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta*. 109: 448-453.
- WRIGHT, J., SHIMABUKURO, R., H. 1982. Effect of diclofop-methyl and diclofop on the membrane potentials of wheat and oat coleoptiles. *Plant Physiology*. 85: 188-193.
- YENNE, S., P., HATZIOS, K., K. 1991. Molecular comparison of selected herbicides and their safeners by computer-aided molecular modelling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38: 1950-1956.
- YOSHIDA, K., IGARASHI, E., MUKAI, M., HIRATA, K., MIYAMOTOA, K. 2003. Induction to tolerance to oxidative stress in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, by abscissic acid. *Plant, Cell and Environment*. 26: 451-457.
- YOUSEF, N., PISTORIUS, E., K., MICHEL, K.-P. 2003. Comparative analysis of *idiA* and *isiA* transcription under iron starvation and oxidative stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 wild-type and selected mutants. *Archives of Microbiology*. 180: 471-483.
- ZAMA, PAUL, HATZIOS, KRITON, K. 1986. Interactions between the herbicide metolachlor and the safener CGA-92194 at the levels of uptake and macromolecular synthesis in sorghum leaf protoplasts. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 27: 86-96.

ZHOU, WENBIN, JUNEAU, PHILIPPE, QIU, BAOSHENG. 2006. Growth and photosynthetic responses of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to elevated levels of cadmium. *Chemosphere*. 65: 1738–1746.

ZUBER, H. 1986. Structure of light harvesting antennae complexes of photosynthetic bacteria, cyanobacteria and red algae. *Trends in Biochemical Science*. 11: 414-419.

## ANNEXE A

Tableau A.1. Quantité en  $\mu\text{g}$  de chlorophylle  $a$  par cellules pour UTCC 299 exposé à 0, 0,01 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Aatrex pendant 24 et 96 heures.

299 Aatrex		24 h	96 h
0 $\mu\text{M}$	$\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{cell}$	20,28 E-08	33,72 E-08
	Écart-type	3,35E-08	4,88E-08
0,01 $\mu\text{M}$	$\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{cell}$	32,20 E-08*	31,47 E-08
	Écart-type	5,60E-08	7,66E-09
0,1 $\mu\text{M}$	$\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{cell}$	27,98 E-08	34,19 E-08
	Écart-type	3,70E-08	1,59E-08

• significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

•

Tableau A.2. Quantité en  $\mu\text{g}$  de chlorophylle  $a$  par cellules pour UTCC 299 exposé à 0, 0,01 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra II magnum pendant 24 et 96 heures.

299 Primextra II magnum		24 h	96 h
0 $\mu\text{M}$	$\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{cell}$	15,34 E-08	32,32 E-08
	Écart-type	1,99E-08	4,60E-08
0,01 $\mu\text{M}$	$\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{cell}$	16,30 E-08	19,30 E-08*
	Écart-type	1,26E-08	1,37E-08
0,1 $\mu\text{M}$	$\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{cell}$	20,08 E-08	17,65 E-08*
	Écart-type	3,60E-08	3,69E-08

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

Tableau A.3. Quantité en  $\mu\text{g}$  de chlorophylle  $a$  par cellules pour UTCC 632 exposé à 0, 0,01 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Aatrex pendant 24 et 96 heures.

632 Aatrex		24 h	96 h
0 $\mu\text{M}$	$\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{cell}$	15,38 E-08	21,59 E-08
	Écart-type	6,29 E-09	1,17E-08
0,01 $\mu\text{M}$	$\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{cell}$	17,89 E-08*	21,61 E-08
	Écart-type	1,55 E-08	1,30E-08
0,1 $\mu\text{M}$	$\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{cell}$	16,13 E-08	19,51 E-08
	Écart-type	5,49 E-09	1,55E-08

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

Tableau A.4. Quantité en  $\mu\text{g}$  de chlorophylle *a* par cellules pour UTCC 632 exposé à 0, 0,01 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra II magnum pendant 24 et 96 heures.

632 Primextra II magnum		24 h	96 h
0 $\mu\text{M}$	$\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{cell}$	20,73 E-08	17,15 E-08
	Écart-type	6,10E-08	4,08E-08
0,01 $\mu\text{M}$	$\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{cell}$	16,72 E-08*	21,92 E-08*
	Écart-type	4,58E-08	2,68E-08
0,1 $\mu\text{M}$	$\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{cell}$	22,31 E-08	19,91 E-08
	Écart-type	1,83E-08	2,33E-08

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )



## ANNEXE B

Tableau B.1. Volume cellulaire de UTCC 299 exposée à 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Aatrex pendant 24 heures et 96 heures.

Traitement	Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	
	24 heures	96 heures
Témoins	55,59	66,64
Écart-type	$\pm 0,653$	$\pm 1,755$
0,1 $\mu\text{M}$	53,28	54,41*
Écart-type	$\pm 2,398$	$\pm 2,833$

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

Tableau B.2. Volume cellulaire de UTCC 299 exposée à 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra II magnum pendant 24 heures et 96 heures.

Traitement	Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	
	24 heures	96 heures
Témoins	54,63	60,68
Écart-type	$\pm 0,172$	$\pm 1,329$
0,1 $\mu\text{M}$	50,05*	45,25*
Écart-type	$\pm 0,605$	$\pm 1,474$

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

Tableau B.3. Effets de 0 et 0,1  $\mu\text{M}$  de Primextra reconstitué avec et sans le phytoprotecteur Benoxacor sur le volume cellulaire de UTCC 299 exposé pendant 24 et 96 heures. PR signifie Primextra reconstitué. Les concentrations de Benoxacor testées sont de 2% (p/p) et 4% (p/p).

Traitement	Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	
	24 heures	96 heures
Témoins	1	1
Écart-type	$\pm 0,024$	$\pm 0,025$
0,1 $\mu\text{M}$ PR	0,938	0,900*
Écart-type	$\pm 0,014$	$\pm 0,014$
0,1 $\mu\text{M}$ PR+2%	0,914	0,841*
Écart-type	$\pm 0,005$	$\pm 0,005$
0,1 $\mu\text{M}$ PR+4%	0,909	0,832*
Écart-type	$\pm 0,003$	$\pm 0,012$

\* significativement différent du témoin ( $P < 0,05$ )

